



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“ESTUDIO TRIDIMENSIONAL DE LA
FORMACIÓN DE LOS EJES
CROMOSÓMICOS Y DEL COMPLEJO
SINAPTONÉMICO”.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :

B I Ó L O G O

P R E S E N T A :

ALBERTO CARLOS MARTÍNEZ.



**FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM**

DIRECTOR DE TESIS:
Dr. GERARDO HEBERT VÁZQUEZ NIN

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Microscopia Electrónica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Gerardo Hebert Vázquez Nin.

Con apoyo económico del SNI para el proyecto “Estudio del posible papel del ARN en el reconocimiento, alineación y apareamiento de los cromosomas homólogos en meiosis”.

Un ojo.

Presa de un cuento con crisis de ausencia y devorando colores... siempre inmóvil, comunicada sólo por el sutil movimiento de un párpado... enjaulada por su propio cuerpo, su cuento. Hoy me he despertado sin querer decir nada, en mis sueños se habló tanto que me he quedado sin habla... hoy todo lo veo lejos... sin miedo, sólo dudas que van cayendo todavía al escapar, como no queriendo terminar de llegar al suelo fertilizado por animas errantes. Quizás cuando los peces se hayan bebido todo el mar la mente arrastrará de nuevo hasta lo impensable, siempre a través de pelos de ratas incendiadas que han perdido sus sombras.

Lakshmi Charli J.

Agradecimientos.

Al gran equipo de trabajo del laboratorio, un abrazo a la Mtra. Ernestina Ubaldo, a la Mtra. Silvia Juárez, al M. en C. Marco Antonio González, al Dr. Luis Felipe Jiménez, a la Dra. Lourdes Segura, a la Dra. Rosario Ortiz, a la Dra. Guadalupe Zavala, al M. en C. Roberto Salgado Delgado, por sus valiosas enseñanzas.

A Citlali una gran persona que admiro mucho, y aunque de lejos te deseo lo mejor a ti y a tu familia saben que cuentan conmigo.

Mis mayores agradecimientos son para la Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez y para el Dr. Gerardo Hebert Vázquez Nin por sus atenciones inigualables, su paciencia, sus valiosas enseñanzas y dedicación, con cariño y respeto los llevo en el corazón.

Agradezco profundamente a todos mis amigos y compañeros de la universidad por compartir momentos inolvidables, a la banda por su apoyo: Lucia Castellanos, Mariana Gutiérrez, Lakshmi, Diego Valencia, Poncho de la Vega, Rafael Pompa, Marcos Flores, Fernando, Alex, Carlo, Pablo Gesundheit, Bernardo, Paquito por tu invaluable ayuda, Constanza, David Castillo, a los otros Diegos, mis queridísimas Elda y Fernandita, Francisco, Gibran, Gimena, Israel García y familia, Domingo Arenas y familia, Eric, Kim Ley, Lalo Najera, Lila, Yosune Miquelajauregui, Gabriel y José Davidov Pardo, Nievska, Anita Leshner, Neto, Nikita, Pablito, Yvs, Víctor, Xumo y a ti especialmente Perlita Valencia.

Agradezco profundamente al Dr. Ignacio Vázquez Rojas, a la Dra. Patricia Joseph Bravo, al Dr. Jean Louis Charli Casalonga y a la Dra. Annie Pardo Semo por su tiempo y gran apoyo.

A toda mi familia que sin duda siempre me apoyó, mis tíos Fernando y Ana, Luis y Esperanza, Nacho y Gaby, Yolanda, Mateo y Cony, Pedro y Pablo☩ y familia, Miguel Martínez y Yoyis, Honorio y Leticia, Juanis, Eduardo☩, a mis hermanos Mauricio y Ricardo, los adoro. A todos mis primos, Toño, Lorena, Ana, Gaby, Adriana, Cristina, Victor, Alonso, Alan, Ameyalli, Santiago, Carolina, Aldo, Elizabeth, Sergio, Honorio, Lety, Jesu, Carmelita, Miguel, Cecilia, Carlos, Susana y Lalo por todo lo que ya saben y nos falta aprender, a la familia Caballero siempre contara conmigo.

A mis padres A. Alberto Carlos Hernández y Susana O. Martínez Mireles por darme la oportunidad de vivir, los amo. A ti especialmente Abue☩, donde estas me acompañas en mis pensamientos.

ÍNDICE

• Índice.	6
• Resumen.	7
• Introducción.	9
-Antecedentes	9
-Diferencias entre mitosis y meiosis	11
-Histología del testículo de mamíferos	12
-Ciclo celular	13
-División meiótica 1	14
-División meiótica 2	19
-Justificación del trabajo	19
• Hipótesis.	22
• Objetivos.	23
-Objetivo General	23
-Objetivos particulares	23
• Material y Métodos.	24
-Análisis Citoquímico	24
-Análisis Inmunocitoquímico	26
• Resultados.	32
• Discusión.	49
• Conclusión.	57
• Bibliografía Consultada.	58

Resumen.

Los animales, hongos y plantas generalmente se reproducen por vía sexual, esto implica la necesidad de células especializadas en la fecundación, particularmente en los mamíferos son espermatozoides en el género masculino y óvulos en el femenino (n). Cuando estas células se fusionan, forman el cigoto ($2n$) que va a ser distinto genéticamente a la generación anterior, debido a los procesos meióticos.

La meiosis es un proceso altamente conservado en la evolución, que consiste en dos divisiones, en la profase de la primera división meiótica sucede el reconocimiento, alineación, recombinación y segregación de los cromosomas homólogos. La profase meiótica I está dividida en 4 estadios: leptoteno, zigoteno, paquiteno y diploteno. Sin duda esta es la fase más larga y compleja de la meiosis. No se sabe como es que cada cromosoma busca y encuentra su homólogo dentro del núcleo teniendo en cuenta que frecuentemente están a varios micrómetros de distancia. Mi trabajo tiene como objetivo estudiar la distribución del ADN y el ARN en las etapas en las que se lleva a cabo el reconocimiento, alineación y apareamiento de las regiones homólogas, así como durante la formación del complejo sinaptonémico. Para abarcar un amplio período comencé mi estudio con los núcleos de espermatogonias tipo B y lo continué con las fases de la profase meiótica I en espermatocitos primarios de testículo de rata. Utilicé técnicas de citoquímica ultraestructural, inmunolocalización para ADN y cortes seriados a nivel de microscopía electrónica.

Los núcleos de espermatogonias tipo B presentan características morfológicas que no existen en otros tipos celulares. Estas características son:

Primero, ejes irregulares de cromatina laxa que se alterna con cromatina semicompacta, que parten de cúmulos de cromatina compacta adosada a la membrana nuclear y llegan a medir hasta un radio nuclear.

Segundo, estructuras microplumuladas formadas por cromatina laxa que presentan un eje principal constituido por dos filamentos finos axiales del cual parten numerosas asas finas de cromatina en forma radial dando el parecido de un árbol navideño.

Por medio de citoquímica ultraestructural pude demostrar la presencia de ADN y ribonucleoproteínas en estas estructuras, lo que nos indica que se encuentran en proceso de transcripción.

En la interfase meiótica también llamada pre-leptoteno, el núcleo se caracteriza por un aumento en la decompactación de la cromatina, y abundancia de microplumulados. Éstos se encuentran frecuentemente en disposición paralela, relacionándose por medio de los filamentos radiales como ramas que conectan un eje con el otro atravesando el espacio entre ellos, dando el parecido a una escalerilla de doble cuerda. Las técnicas de citoquímica ultraestructural también demuestran que las escalerillas de doble cuerda están constituidas por ADN y ribonucleoproteínas.

Se demuestra con cortes seriados que los ejes cromosómicos están frecuentemente alineados en paralelo antes de la formación del CS. Durante el estadio leptoteno la estructura preexistente se mantiene. Algunas de estas estructuras microplumuladas comienzan a densificarse por la agrupación de partículas EDTA positivas, formándose así los elementos axiales. Algunos se

forman en paralelo con otro, sin embargo también los encontramos aislados, pero conservando su estructura de microplumulado. Durante estos procesos continúa intensamente la transcripción, pero el proceso de splicing sigue siendo escaso.

Los ejes cromosómicos presentan asas o filamentos radiales muy largos y escasos, pero conforme avanza el estadio leptoteno y comienza el zigoteno se van haciendo más frecuentes y cortas. Propongo que los estadios leptoteno y zigoteno no son diferentes sino un continuo leptoteno-zigoteno, ya que observamos el desarrollo del CS simultáneamente al crecimiento y elongación de los ejes axiales alineados. El inicio de la formación del complejo sinaptonémico es caracterizado por la generación del espacio de exclusión de la cromatina y ribonucleoproteínas entre los ejes axiales apareados que posteriormente serán los elementos laterales del CS. Esto nos indica una redistribución de la cromatina, las asas radiales que parten de los ejes, tienden a compactarse, es decir, desaparecen las asas largas y aumentan las asas cortas, densificando aún más el eje del elemento lateral.

Los elementos laterales del complejo en formación, presentan su eje en continuidad con pares de filamentos finos que contienen ADN. Los filamentos de cromatina presentan asas en forma de pliegues que se van agrupando e incorporando al elemento lateral en el momento de la formación del CS. Algunas de éstas asas están incluidas en la estructura tipo escalerilla de doble cuerda del elemento lateral del CS maduro. Estos elementos laterales se presentan como estructuras ricas en ribonucleoproteínas. Propongo que estas asas cortas contienen ADN con secuencias específicas donde se asocian las proteínas del elemento lateral.

Durante la formación del CS, los filamentos finos que contienen ADN sufren un reacomodo dentro del elemento lateral, uno se observa en la cara central o interna y el otro en el lado externo del elemento lateral. Esta inesperada distribución corresponde al par de filamentos finos previamente descritos en la estructura del elemento lateral.

La presencia de ARN asociado con filamentos finos de ADN así como al elemento axial del cual se forma el CS, puede ser relacionada con la transcripción que ocurre durante la profase meiótica, especialmente durante el estadio leptoteno-zigoteno. Propongo que el ARN funciona como secuencia silenciosa de reconocimiento para el proceso esencial del apareamiento.

A lo largo de cada cromosoma pueden desarrollarse varios CS que luego confluirán en sólo uno por cada bivalente. Los extremos del complejo en crecimiento están en continuidad con estructuras microplumuladas o escalerillas de doble cuerda. Conforme avanza el paquiteno, la cromatina se compacta progresivamente, disminuye la transcripción casi por completo y aumenta el número de gránulos pericromatinianos. Durante el diploteno la estructura tripartita del CS se pierde, primero desaparecen los filamentos transversales y el elemento medial, así como la apariencia de cinta del elemento lateral mientras que poco a poco la cromatina se va transformando en cúmulos de cromatina compacta.

INTRODUCCIÓN:

-Antecedentes

La meiosis es un tipo especial de división celular que se encuentra en los organismos con reproducción sexual. Existe otro tipo de reproducción la asexual o por mitosis, en donde la descendencia es genéticamente idéntica al antecesor. En la mayoría de los organismos multicelulares como son los animales, hongos y plantas, la reproducción es sexual, y existe una alternancia entre haploidía (n), fusión, diploidía ($2n$) y meiosis (De Robertis, E. y De Robertis E.D.P., 1989; Alberts B. et al., 1995). En animales, la haploidía se manifiesta en las células sexuales las cuales se fusionan y forman un cigoto ($2n$), que dará origen a un nuevo organismo. En los animales la fase diploide es más larga y compleja que en otros organismos, ya que pasan la vida en esta fase; por otro lado, la fase haploide es muy corta y sencilla, representada por los gametos (ovocitos y espermatozoides) que están altamente especializados en la fusión sexual (Fig. 1).

El material genético es aportado por ambos progenitores debido a la fusión de ambos núcleos; a este proceso se le conoce como fecundación según De Robertis E. y De Robertis E.D.P. (1989). Posteriormente, las células se multiplican, se diferencian y forman el nuevo organismo. Este nuevo organismo diploide tiene células germinales que entran en proceso de división celular por medio de meiosis para generar nuevamente células haploides, las cuales van a ser distintas genéticamente a la generación anterior debido a los procesos meióticos de recombinación y de segregación, donde los cromosomas homólogos intercambian ADN y sucede la distribución al azar de los bivalentes en la primera metafase meiótica. Gracias a los ciclos de haploidía y diploidía a lo largo del tiempo, desaparecen antiguas combinaciones genéticas y se crean combinaciones nuevas (Alberts B. et al., 1995).

La palabra meiosis viene del griego "meioum" (disminuir), proceso por el cual se produce la reducción a la mitad del número cromosómico, mediante dos divisiones consecutivas, lo que origina 4 células haploides (De Robertis E. y De Robertis E.D.P., 1989).

A las células que llevan a cabo la meiosis se les llama comúnmente meiocitos y sufren tres procesos esenciales:

-Reducción del número cromosómico, porque de no hacerlo, las células hijas tendrían una carga genética de $4n$.

-Recombinación con intercambio de segmentos cromosómicos (bloques de genes) *por medio del "crossing-over"*; ésta característica nos da la gran ventaja de la variabilidad, lo cual aumenta la probabilidad de sobrevivir en un ambiente continuamente cambiante, porque algunos organismos tendrán las características necesarias para enfrentar los problemas que brinda la naturaleza.

-Separación al azar de los cromosomas homólogos, lo que nos asegura que cada gen proviene del padre o de la madre en proporciones cambiantes aumentando así la variabilidad del genoma (De Robertis E. y De Robertis E.D.P., 1989).

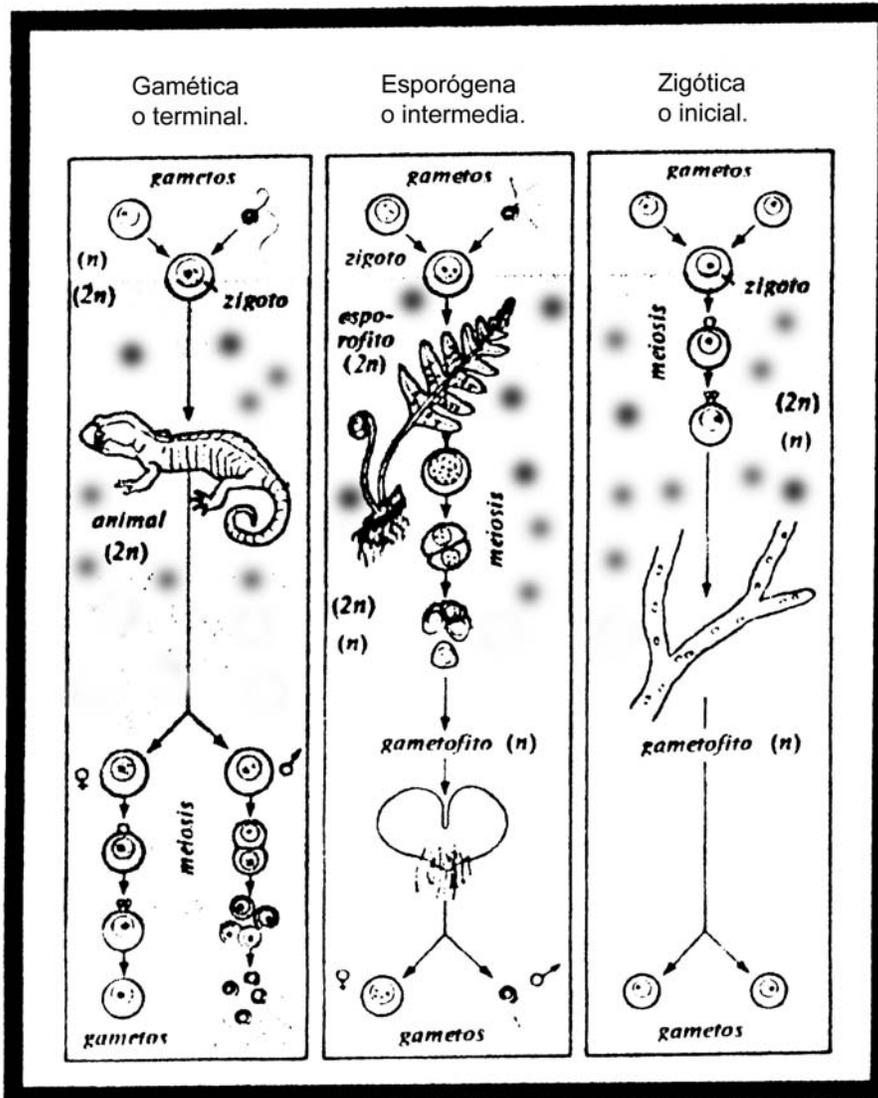


Figura 1. Tipos de meiosis. La zona sombreada corresponde a la fase diploide del ciclo de vida de animales, plantas y hongos. Observamos que estos organismos los conocemos en su fase diploide en la cual pasan la mayor parte de su vida, pero también su fase haploide igual de importante. Según Wilson, tomado de Wolfe S. L. 1972.

-Diferencias entre mitosis y meiosis

La mitosis se lleva a cabo en las células somáticas y la meiosis únicamente en células germinales. Además de que los resultados genéticos de los procesos de división celular son diferentes, en mitosis la carga genética es de $2n$ en cada una de las dos células resultantes y en meiosis las 4 células resultantes son haploides (Fig. 2). Otra diferencia es que la síntesis del ADN en mitosis se da en la fase S seguida de la fase G2 y luego de una división; en cambio en meiosis, la replicación del ADN (en fase S) es anterior a las dos divisiones de la meiosis, por lo que las células que resultan de esas divisiones tendrán la mitad de la cantidad de ADN de las células somáticas. Cada cromosoma en mitosis se comporta individualmente; en meiosis se reconocen las secuencias homologas, se alinean y recombinan. El tiempo de la división celular en mitosis es de aproximadamente entre 1 y 2 horas; en meiosis es de días, semanas y hasta años.

La diferencia fundamental es que en la mitosis el material genético permanece constante, mientras que en meiosis justamente lo importante es que no permanece constante y por lo tanto se genera diversidad genética (De Robertis E. y De Robertis E.D.P., 1989).

Cabe mencionar, que la profase meiótica se diferencia de la profase mitótica en que la forma de la cromatina es más compacta al principio de la profase, dejando espacios libres de ADN en el núcleo.

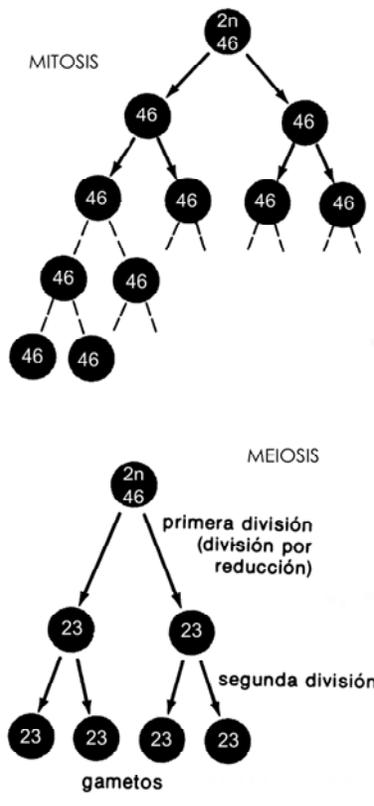


Figura 2. División por mitosis y división por meiosis. Se muestra como en mitosis la carga genética permanece constante y en meiosis obtenemos la reducción de la carga genética a la mitad en la primera división meiótica, en la segunda división se duplican las células pero manteniendo su carga genética "n". Otto J.H. A. Towle, 1989.

<i>Mitosis</i>	<i>Meiosis</i>
En células somáticas	En células que realizan el ciclo sexual
Una división celular, da como resultado 2 células hijas	Dos divisiones celulares dan como resultado 4 productos de la meiosis
El número cromosómico por núcleo se mantiene	El número cromosómico se reduce en dos partes en los productos meióticos
Una fase S premeiótica por cada división celular	Una fase S premeiótica por ambas divisiones celulares.
Normalmente, no hay apareamiento de cromosomas homólogos	Sinapsis completa de cromosomas homólogos en la profase 1
Normalmente, no hay nódulos de recombinación	Al menos un nódulo de recombinación por cada par de cromosomas homólogos
Los centrómeros se dividen en anafase	El centrómero no se divide en anafase 1 sino hasta anafase 2
Proceso conservado.	Proveedor de variación en los productos de la meiosis
Genotipo de las células hijas idénticas al genotipo paternal	
La mitosis puede llevarse a cabo en células haploides y diploides	La meiosis se lleva a cabo en células diploides.

Histología del testículo de mamíferos

El testículo, como el ovario, es una glándula doble, ya que en el aspecto funcional es tanto exocrina como endocrina. Está recubierto por tres capas: la túnica vaginalis, la albugínea y la vascular. Dentro de estas tres capas, el testículo está dividido en aproximadamente 250 compartimientos piramidales llamados lóbulos testiculares, en los cuales se encuentran de uno a cuatro túbulos seminíferos incluidos en tejido conectivo laxo y muchas otras células, predominando las células intersticiales (de Leydig) con gran importancia endocrina (Fig. 3). Cada túbulo seminífero tiene 0.2 mm de diámetro y de 30 a 70 cm de largo. El túbulo seminífero está revestido por un epitelio germinal, el cual es cúbico estratificado muy modificado; además presenta una lámina basal cubierta de tejido fibroso, tejido conectivo, fibroblastos y algunas células mioideas (peri tubulares contráctiles) que actúan como una membrana dinámica capaz de efectuar contracciones periódicas que posiblemente ayuden a conservar una presión adecuada dentro del testículo, el movimiento de los líquidos en los capilares, así como el desplazamiento de los espermatozoides. El epitelio seminífero está compuesto de dos tipos celulares, las células de Sertoli encargadas de nutrir y sostener a otro tipo celular, las espermatogonias, las cuales forman la mayor parte del epitelio y son las que sufren proliferación y diferenciación, es decir se dividen, entran en meiosis, y cumplen la espermatogénesis (Leeson et al., 1990).

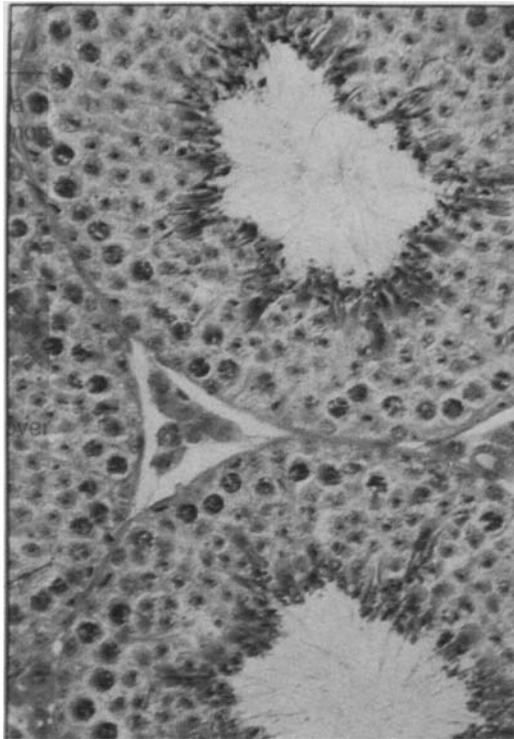


Figura 3. Túbulos seminíferos de humano. Otto J.H. A. Towle, 1989.

Ciclo Celular

La mayoría de las células del organismo se dividen periódicamente. Para lograr esta división, ocurren transformaciones y fenómenos que se suceden en forma cíclica, constituyendo lo que se denomina el ciclo celular. Para dividirse, la célula ha tenido que duplicar previamente su material genético, lo cual ocurre durante el periodo S o sintético del ciclo, por lo que en periodo G1 (presintético) cada cromosoma estará constituido por una cromátida simple, mientras que, después del periodo S, en el periodo G2 (post-sintético), ya aparecerán formados por dos cromátidas unidas por el centrómero. Al final del periodo G2, ocurren las fases que constituyen la mitosis propiamente dicha (Jiménez L.F., Merchant H. 2003, capítulo 27 Fabio Abdel Salamanca Gómez).

La meiosis presenta características particulares en el macho. La espermatogénesis tiene lugar en el testículo, en donde las espermatogonias que se encuentran adosadas a la membrana basal de los túbulos seminíferos, se multiplican activamente por mitosis. Las que se han dividido muchas veces, se van acercando a la luz del túbulo, luego de una división mitótica, una de esas espermatogonias hijas se transforma en espermatogonia tipo "B" (fase G1), la otra, continúa siendo de tipo "A". Las espermatogonias tipo "B" posteriormente pasan a interfase meiótica o preleptoteno (fase S) transformándose propiamente en espermatoцитos primarios que son las células que inician la meiosis.

Las espermatogonias tipo "B" residen entre las de Sertoli y forman de cuatro a ocho capas que ocupan el espacio entre la membrana basal y la luz. En el testículo no desarrollado solo se encuentran las células germinales primitivas o espermatogonias, pero, con el arranque de la madurez sexual, las células espermatógenas aparecen en todos los estados de diferenciación y se disponen en varias capas más o menos definidas (Bailey F.R., Smith P.E., Copenhaver W.M., 1950).

División Meiótica 1

Profase

La meiosis es un proceso que consiste en dos divisiones denominadas división meiótica 1 y división meiótica 2; cada una de estas divisiones meióticas se subdividen en 5 estadios: profase, prometafase, metafase, anafase y telofase.

La profase meiótica que es la primera fase de la primera división celular, es muy compleja y muy larga; las fases restantes son muy rápidas. La profase está dividida a su vez en 5 estadios: *leptoteno*, *zigoteno*, *paquiteno*, *diploteno* y *diacinesis*, observemos la figura 4 (Alberts B. et al., 1995).

Leptoteno

Las **cromátidas** se encuentran unidas a la envoltura nuclear cuando menos en uno de sus extremos y constituye una estructura llamada placa de adhesión, donde el porcentaje de poros nucleares aumenta en los sitios de fijación de los **telómeros** (Schulz-Schaeffer, 1980; Swanson et al., 1981).

El inicio de leptoteno se identifica cuando desaparece la cromatina compacta y aumenta el tamaño nuclear. En los cromosomas leptoténicos se observan los ejes cromosómicos también llamados ejes axiales dentro de la cromatina, como cilindros irregulares (Vázquez-Nin G.H. y Echeverría O.M., 1976). Cada uno de estos cromosomas se empaqueta en bucles de cromatina alrededor de un eje central que se observa denso con el microscopio electrónico de transmisión.

El proceso inicial de reconocimiento de homologías es poco conocido; se trata de una búsqueda de secuencias homólogas que cuando se reconocen se conectan y se estabilizan para formar el **complejo sinaptonémico** (CS) (Moses, 1956) y así intercambiar secuencias de ADN.

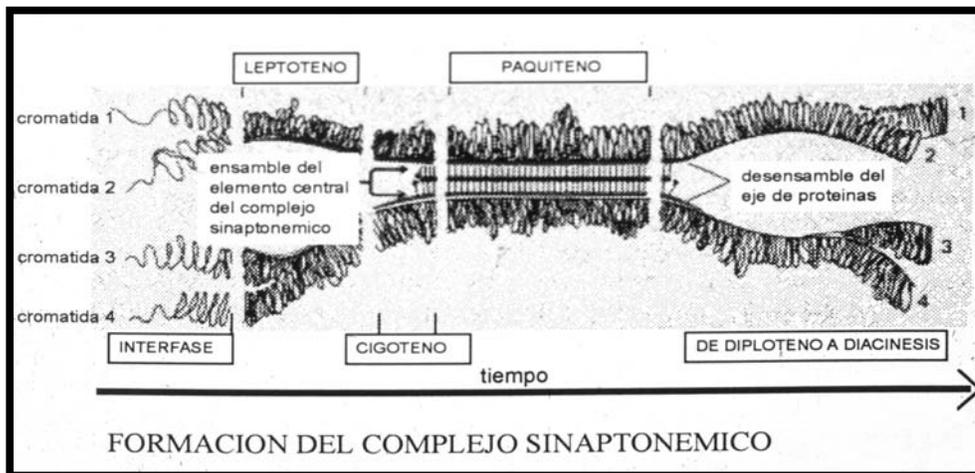
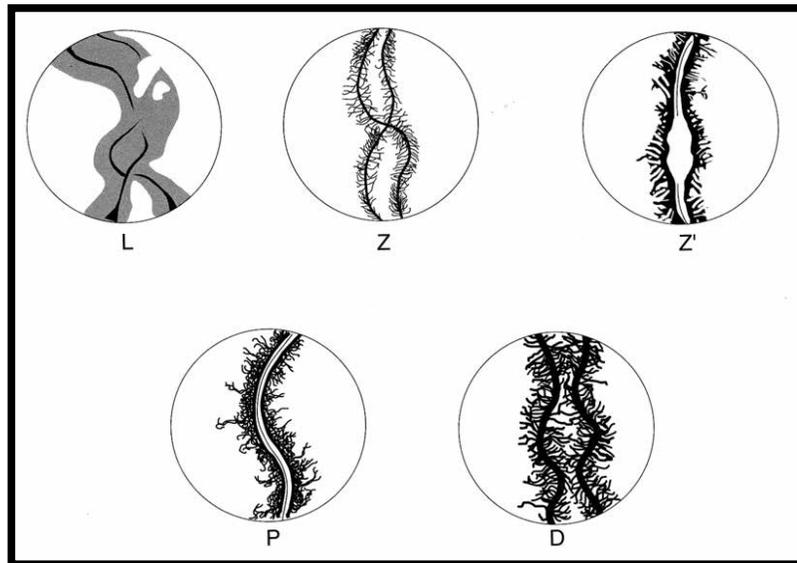


Figura 4. Esquemas del comportamiento de los cromosomas durante la profase meiótica. Arriba según Solari A.J. 1972, abajo Alberts B. 1995.

Zigoteno

En el estadio zigoténico, los ejes axiales sufren un pequeño cambio en su estructura: el eje central tiene un desplazamiento lateral con respecto a las asas de cromatina formando así los elementos laterales del CS. (Loidl, 1991)

El zigoteno comienza con la sinapsis de los cromosomas homólogos: se alinea un cromosoma del padre y otro de la madre, se aparean pero no se fusionan, puesto que permanecen separados por una distancia de 100 nm aproximadamente, que es ocupado por el CS (von Wettstein et al., 1984). En la región de apareamiento del bivalente es posible observar la continuidad entre los ejes axiales y la típica estructura tripartita del CS (Ortiz et al., 2002; Vázquez-Nin et al., 2003).

Paquitenio

La presencia de ARN en el CS fue reportada por Wolsteholme y Meyer (1966) usando histoquímica óptica y microscopía electrónica. El uso del procedimiento de tinción preferencial para ribonucleoproteínas (RNPs) en microscopía electrónica (Bernhard, 1969) revela la presencia de RNPs en el elemento lateral del CS y en ejes axiales leptoténicos y zigoténicos (Esponda y Stocker, 1971; Vázquez-Nin y Echeverría, 1976). Además, las partículas RNPs también se han localizado en los puentes fibrilares de los elementos axiales apareados en zigoteno (Vázquez-Nin y Echeverría, 1976; (Ortiz et al., 2002; Vázquez-Nin et al., 2003).

Se sabe que el complejo sinaptonémico está involucrado en el apareamiento de los cromosomas homólogos debido a reconstrucciones tridimensionales (Moses, 1968; Sotelo, 1969; Comings y Okada, 1970). Además está formado por dos gruesos elementos laterales (EL), que se disponen paralelamente uno con el otro; un delgado elemento medial (EM) y varias fibrillas latero-mediales (LM), que corren transversalmente entre ambos elementos laterales uniéndolos entre sí y formando el elemento medial. El conjunto de estas estructuras forma la estructura tripartita típica de las células en profase meiótica descubierta por Moses en 1956 y ahora observada en meiocitos de toda clase de eucariontes (Moses, 1968; Sotelo, 1969; Westergaard y von Wettstein, 1972; Gilles, 1975; von Wettstein et al., 1984; Loidl, 1990,1991).

El complejo sinaptonémico está formado por varias proteínas y cada una de ellas se encuentra en regiones específicas de este: 1) Una de ellas es la proteína 1 del complejo sinaptonémico (Synaptonemal Complex Protein one, SCP 1). Esta proteína tiene 125 KD; cuando se secuenció se vio que tiene una estructura fibrilar en alfa hélice; forma dímeros con otra y tiene una longitud de 100 nm, que es la distancia que separa los dos elementos laterales. 2) Otra proteína es la SCP 2 que tiene 173 KD, se observa en los elementos laterales del complejo sinaptonémico e interactúa con las fibrillas de cromatina. Tanto la SCP 1 como la SCP 2 son proteínas poco flexibles, esto es porque tienen una estructura fibrilar lo cual les da mayor resistencia. 3) La SCP 3 tiene una masa pequeña de 30-33 KD, es componente de los elementos laterales; es una proteína estructural. 4) Una última proteína, la SC 48 pertenece a las fibras transversales e interactúan con el elemento medial. Todas estas proteínas son de tipo estructural del complejo y no se sabe si están involucradas en el apareamiento (Smith y Benavente, 1992). El elemento medial solo se observa cuando los elementos laterales se disponen en paralelo (Vázquez-Nin y Echeverría, 1976).

El apareamiento es muy específico (gen-gen) ya que se da un reconocimiento de secuencias homologas; puede darse en cualquier lugar a lo largo del cromosoma o en distintos lugares al mismo tiempo y seguir apareándose hacia los extremos, o iniciar en la placa de adhesión y seguir el reconocimiento hacia el otro extremo (De Robertis E. y De Robertis E.D.P. 1989).

Durante el paquiteno (del griego pachus, grueso) el apareamiento de los cromosomas se completa. Los cromosomas se contraen longitudinalmente y se acortan.

Los elementos laterales contienen altas concentraciones de ribonucleoproteínas en los primeros estadios de la profase meiótica, los que escasean en paquiteno avanzado, y están ausentes en diploteno (Vázquez-Nin y Echeverría, 1976).

La recombinación se produce en el paquiteno cuando ocurren rupturas transversales en un mismo nivel de las cromátidas, seguidas por el intercambio y la fusión de los segmentos intercambiados. En el elemento medial se ensamblan los nódulos de recombinación (Westergaard y von Wettstein, 1970, 1972), localizados como pelotas sobre una escalera entre los dos cromosomas homólogos (Alberts et al., 1989). Westergaard y von Wettstein (1970, 1972) describen los nódulos de recombinación como estructuras esféricas o elipsoidales situadas entre los elementos laterales del complejo sinaptonémico en *Neotiella*. Carpenter (1975) encuentra esas estructuras en los oocitos de *Drosophila Melanogaster* y correlaciona la frecuencia y la distribución de éstos nódulos con el crossing over o recombinación.

Stern y Hotta (1984) han observado una pequeña síntesis de ADN en los estadios zigoténico y paquiténico que puede estar relacionada al reconocimiento (ADN-zigoténico) y con el crossing over (ADN-paquiténico). El ADN sintetizado en paquiteno se encuentra en regiones específicas del cromosoma. Dicha síntesis es de tipo replicación-reparación, cercana a los extremos rotos de los cromosomas relacionados con el proceso de recombinación (Stern y Hotta, 1978). Esto ocurre preferencialmente en las regiones del genoma que contienen secuencias repetidas de aproximadamente 200 pares de bases, asociadas a la actividad enzimática de la endonucleasa que provoca cortes en las dos moléculas de ADN. Posteriormente se produce el desenrollamiento de las cadenas de ADN y la reunión de las mismas en las cromátidas opuestas. (De Robertis E. y De Robertis E.D.P., 1989)

La recombinación génica no es constante a través del genoma y puede ser suprimida por la vecindad de la heterocromatina. La cantidad de heterocromatina asociada con el complejo sinaptonémico en paquiteno es mucho menor que la localizada en cromosomas mitóticos. La baja cantidad de heterocromatina puede ser causada por una gran compactación comparada con la eucromatina, proporcionando una restricción física sobre los procesos de "crossing over" en regiones heterocromáticas (Ashley, 1988).

Las proteínas de recombinación de organismos eucariontes que se han estudiado son: Rad51, Dmc1 y Rad52. La proteína Dmc1 humana es una recombinasa meiótica específica que conserva una estructura molecular similar a la RecA de bacterias (Passy et al., 1999).

Diploteno

En el diploteno, los cromosomas íntimamente apareados comienzan a separarse. La separación no es completa, ya que los cromosomas homólogos permanecen unidos por los puntos de intercambio o quiasmas (von Wettstein, 1977). A éstos se les considera generalmente como la expresión de un fenómeno genético ("crossing over"). Este estadio está caracterizado por una progresiva decompactación de la cromatina y la desaparición del complejo sinaptonémico. Al mismo tiempo se observan fibras pericromatinianas en el área de la cromatina extendida y los gránulos pericromatinianos son pocos y siempre están en contacto con la cromatina (Vázquez-Nin y Echeverría, 1976).

Diacinesis

En diacinesis, las tétradas se distribuyen más homogéneamente en el núcleo y el nucleolo desaparece. En este estadio se forman pequeñas masas de cromatina compacta en la membrana nuclear. Los gránulos pericromatinianos son abundantes, localizados alrededor de pequeños cúmulos de cromatina densa. En los ovocitos la disposición de estos elementos es similar a la del núcleo interfásico (Vázquez-Nin y Echeverría, 1976).

Prometáfase

Durante la prometáfase 1, los cromosomas continúan su condensación. La envoltura nuclear se rompe y los microtúbulos del huso se ensamblan a los cinetocoros. Cada cromosoma homólogo se une a uno de los polos por el centrómero homólogo; de esta manera las cromátidas hermanas se comportan como una unidad funcional.

Metáfase

En la metáfase 1, los cromosomas se disponen en el plano ecuatorial. Los homólogos se hallan asociados por los extremos, orientando sus centrómeros hacia cada uno de los polos.

Anafase

En anafase 1, las cromátidas hermanas de cada homólogo, unidas por su centrómero se dirigen a los respectivos polos. Esta separación de los homólogos constituye la base física de la segregación de los bivalentes.

Telofase

La telofase 1 inicia cuando los centrómeros llegan a sus respectivos polos. Los cromosomas pueden persistir condensados por un tiempo. Se forman dos núcleos hijos (cariocinesis) y el citoplasma también completa su división (citocinesis), mediante un plegamiento de la membrana que comienza desde la periferia, en la parte media y va progresando hacia el centro de la célula, de tal suerte que finalmente se obtienen dos células hijas con igual dotación de cromosomas y de citoplasma (Jiménez L.F., Merchant H. 2003, capítulo 27. Salamanca F.A.).

En la interfase entre dos divisiones meióticas no hay duplicación del ADN y los cromosomas se encuentran en número haploide (De Robertis E. y De Robertis E.D.P., 1989). Estas dos células entran en la división meiótica 2, que es básicamente una mitosis normal.

División meiótica 2

Metafase 2

En la metafase 2, los cromosomas se colocan en el plano ecuatorial de cada célula y aparecen unidos por el centrómero al huso acromático.

Anafase 2

En la anafase 2 ocurre la división longitudinal del centrómero, lo que permite que cada cromátida se separe y unida por su centrómero al huso acromático, migre hacia el polo respectivo de la célula (Jiménez L.F., Merchant H. 2003, capítulo 27. Salamanca F.A.).

Telofase 2

Se lleva a cabo cariocinesis y la citocinesis mediante el plegamiento de la membrana desde la periferia hacia el centro de la célula, finalmente tenemos tétradas con número cromosómico "n".

-Justificación del trabajo.

Estudios ultraestructurales demostraron la universalidad de la presencia del complejo sinaptonémico en la profase meiótica. Este hecho dio base a la hipótesis que el CS está relacionado con el apareamiento de los cromosomas homólogos, con la recombinación y con la segregación. (Sotelo, 1969) Sin embargo, la observación de que el apareamiento por medio del CS no asegura la recombinación (Stack S., 1973, Rasmussen S. W., 1977), sugirió que el CS puede ser necesario pero no suficiente para la recombinación. La presencia de CS en las levaduras haploides (Loidl J. et al., 1991), el hecho de que la recombinación puede tener lugar sin CS (Bähler J. et al., 1993) y la presencia de CS mediando la asociación de cromosomas heterólogos (Jenkins G. Okumus A., 1992.), proyectó dudas sobre la hipótesis de que el CS es necesario para funciones meióticas como el apareamiento y la recombinación. En lo referente al apareamiento se discute la posibilidad de que los cromosomas asociados en células somáticas de dípteros (von Wettstein et al., 1984) y de levaduras pudieran conservar sus alineaciones hasta zigoteno. Sin embargo, algunos autores sostienen que los movimientos que dan lugar al bouquet destruirían las relaciones cromosómicas previas (Zickler D. y N. Kleckner, 1998). En algunos hongos, plantas y animales se han encontrado alineamientos de cromosomas homólogos en estadios previos al zigoteno (Zickler D. y N. Kleckner, 1998). Estas observaciones indican que mucho antes de que el CS se haya formado, ya existen procesos de reconocimiento de homologías y de alineamiento de los cromosomas

homólogos (Ortiz et al., 2002; Vázquez-Nin et al., 2003). Sin embargo, la relación del CS con la recombinación parece ser evidente en diversos eucariontes excluyendo a las levaduras. Las evidencias más importantes de esta relación derivan de la presencia de los nódulos de recombinación en el CS, en especial los asociados al espacio central del complejo (Carpenter A., 1975, 1979-a, 1979-b).

El apareamiento de los cromosomas homólogos se produce en hembras de *Drosophila* en ausencia de intercambio genético y el CS se forma en mutantes sin recombinación ("crossing over") ni conversión génica (McKim et al., 1998).

Los estudios sobre la localización y la citofisiología del ADN y del ARN en la profase meiótica son incompletos y no permiten una comprensión clara de sus funciones en relación con los principales procesos meióticos. Los métodos citoquímicos muestran la presencia del ARN (Esponda y Stocker, 1971), del ADN (Latos-Bielenska A., 1990; Vázquez Nin G.H. et al., 1993.) o de ambos (Welsch B., 1973; Vázquez-Nin G.H. y Echeverría O.M. 1976) en el CS. El ADN es el principal componente de los elementos laterales de dicho complejo, pero es excepcional en el espacio central del mismo. El ADN se encuentra en el espacio central únicamente en los nódulos de recombinación (Vázquez Nin G.H. et al. 1993.). Esta observación sugiere que el CS es lugar donde se produce el intercambio de cromátidas. El análisis molecular del ADN de CS aislado está enriquecido en secuencias "line/sine" y en dímeros CA repetidos en tándem. (Pearlman R. et al. 1992; Karpova O. et al. 1995). Estas secuencias son muy similares a las encontradas en las inmediaciones de los puntos de ruptura de recombinación. (Satyanarayana K. y Strominger J. 1992). En profase meiótica, en especial en zigoteno y paquiteno, hay síntesis de ADN probablemente diferente a la síntesis de reparación. La síntesis paquiténica produce secuencias moderadamente repetidas y muy conservadas en las plantas. (Friedman B. et al. 1982) El ADN sintetizado en zigoteno es menos conocido, hay evidencias autorradiográficas de que es un componente de los ejes axiales y más tarde de los elementos laterales del CS. (Kurata N. e Ito M. 1978).

Desde la década de los años cincuenta se puso de manifiesto que la transcripción continúa durante la profase meiótica en plantas (Taylor H. 1959), artrópodos (Muckenthaler F.A. 1964) y mamíferos (Monesi V. 1965). La síntesis es más rápida en leptoteno que en zigoteno y la concentración citoplasmática del ARN es baja, indicando que la mayoría de éste permanece en el núcleo (Magee P.T. 1987; Ortiz et al., 2002; Vázquez-Nin et al., 2003). La transcripción en paquiteno también es elevada y el ARN permanece largo tiempo en el núcleo como en estadios anteriores (Eddy E. M. y O'Brien D.A. 1998). Sin embargo, ninguno de estos datos sugiere una función del ADN o del ARN relacionada con el reconocimiento de secuencias homólogas que puedan representar la base molecular de la gran especificidad demostrada por el apareamiento final que acontece durante el zigoteno.

Recientemente, se encontró que los cromosomas se aparean si son activos en transcripción, lo que sugiere que el reconocimiento de secuencias complementarias está involucrado en el reconocimiento de homologías (Cook P.R. 1997; Ortiz et al., 2002; Vázquez-Nin et al., 2003).

En mi tesis intento localizar en forma tridimensional al ARN en espermatogonias tipo "B", en la interfase premeiótica y sobre todo en leptoteno y zigoteno, cuando ocurre el apareamiento final y la formación del CS. Para ello se utilizarán procedimientos de alta resolución específicos en cortes seriados.

Los cambios de la localización del ARN en el tiempo nos darán claves del papel citofisiológico del mismo en el reconocimiento, alineación y apareamiento de cromosomas homólogos.

HIPÓTESIS.

Para explicar el reconocimiento y alineación de los cromosomas homólogos, así como su posterior apareamiento final y formación del CS, proponemos la siguiente hipótesis: el ARN y/o el ADN median el reconocimiento específico por complementariedad de secuencias en fases previas a la formación del CS, el cual representa un andamiaje núcleo-proteico, producto del apareamiento final.

OBJETIVO GENERAL.

Estudiar la distribución del ARN en las etapas en las que se lleva a cabo el reconocimiento de regiones homólogas, la alineación y el apareamiento final, así como también en el complejo sinaptonémico completamente formado, con el fin de poner de manifiesto si está involucrado en dichos procesos.

Objetivos particulares.

1-Reconstruir tridimensionalmente las estructuras de reconocimiento, alineación y sinapsis.

2-Localizar el ARN en espermatogonias tipo "B", espermatoцитos leptoténicos y zigoténicos para verificar las relaciones entre las diferentes estructuras meióticas.

3-Localizar el ADN en espermatogonias tipo "B", espermatoцитos leptoténicos y zigoténicos para verificar las relaciones entre las diferentes estructuras meióticas con técnicas citoquímicas ultraestructurales.

4-Inmunolocalizar el ADN en estructuras de la profase meiótica.

MATERIAL Y MÉTODO.

Para obtener la información que se plantea en los objetivos se realizó la siguiente metodología experimental.

Análisis Citoquímico.

Se procesó el material biológico con la técnica estándar para microscopía electrónica. Se utilizaron testículos de rata joven Wistar en todos los experimentos; estos fueron extraídos bajo anestesia, se cortaron en pedazos pequeños y fueron fijados por inmersión en glutaraldehído al 2.5 % en buffer de fosfatos 0.2 M a pH 7.2 durante 1 hora a temperatura ambiente.

Posteriormente, la deshidratación se llevó a cabo con alcohol etílico gradual cada 10 minutos, desde 60%, 70%, 80%, 96%, hasta absoluto. Se utilizó óxido de propileno como una sustancia de enlace, intermedia entre la deshidratación y la preinclusión. La preinclusión se realizó con una solución de óxido de propileno al 50 % más 50 % de resina epóxica (Glycidether 100, MERCK), a temperatura ambiente por 24 horas. Se polimerizó a 60° C durante 24 horas en resina epóxica al 100%. Se incluyó en esta resina para facilitar el corte seriado.

De las muestras incluidas se realizaron cortes semifinos de aproximadamente 400 nm de grosor; estos cortes fueron coloreados con azul de toluidina y observados con microscopía óptica. Se eligió la zona de interés en algún túbulo seminífero, debido a las asociaciones celulares que Leblond y Clermont reportan en 1952 y se disminuyó la cara de la muestra, para obtener cortes ultrafinos entre 40-60 nm de grosor.

Estos cortes fueron montados en rejillas de cobre de diferente densidad de barrotes, como se observan en la figura 5, previamente cubiertas con formvar, para la tinción general con acetato de uranilo y citrato de plomo. Otras de estas rejillas fueron contrastadas con la técnica de Bernhard (1969), preferencial para ribonucleoproteínas.

Se llevó a cabo la reconstrucción tridimensional de porciones de núcleos para obtener una visión clara de las regiones de reconocimiento, alineamiento y apareamiento, mismas que resultan difícilmente discernibles en cortes al azar. Para ello se hicieron cortes seriados (20 a 40) con la finalidad de obtener reconstrucciones parciales de núcleos. Este paso sin duda es el más complicado debido a que la obtención de cortes seriados es difícil (Fig. 5).

Teniendo cortes seriados montados en porta-especímenes especiales, se llevó a cabo el contraste del material con los procedimientos de tinción general (Ur-Pb) y preferencial para RNPs (Bernhard, 1969).

También se utilizaron rejillas de oro sin formvar, para montar cortes no seriados y aplicar la técnica de contraste específica para ADN (amina de osmio), de Cogliati y Gautier (1973), modificada por Vázquez-Nin *et al.* (1995).

Se observaron las preparaciones en el microscopio electrónico de transmisión, EM10 Carl Zeiss (Fig. 6), y se tomaron fotografías de núcleos de espermatoцитos con estructuras de la profase meiótica. Luego de obtener el material fotográfico se llevó a cabo el estudio del mismo. Para las reconstrucciones tridimensionales se analizaron las continuidades entre estructuras meióticas con ayuda de calcas sobre papel transparente de las imágenes obtenidas de los cortes, colocando la transparencia de un corte sobre la imagen de los cortes adyacentes, observando así, la relación entre ellas.

Diagrama de flujo 1, procedimiento estándar del material biológico.

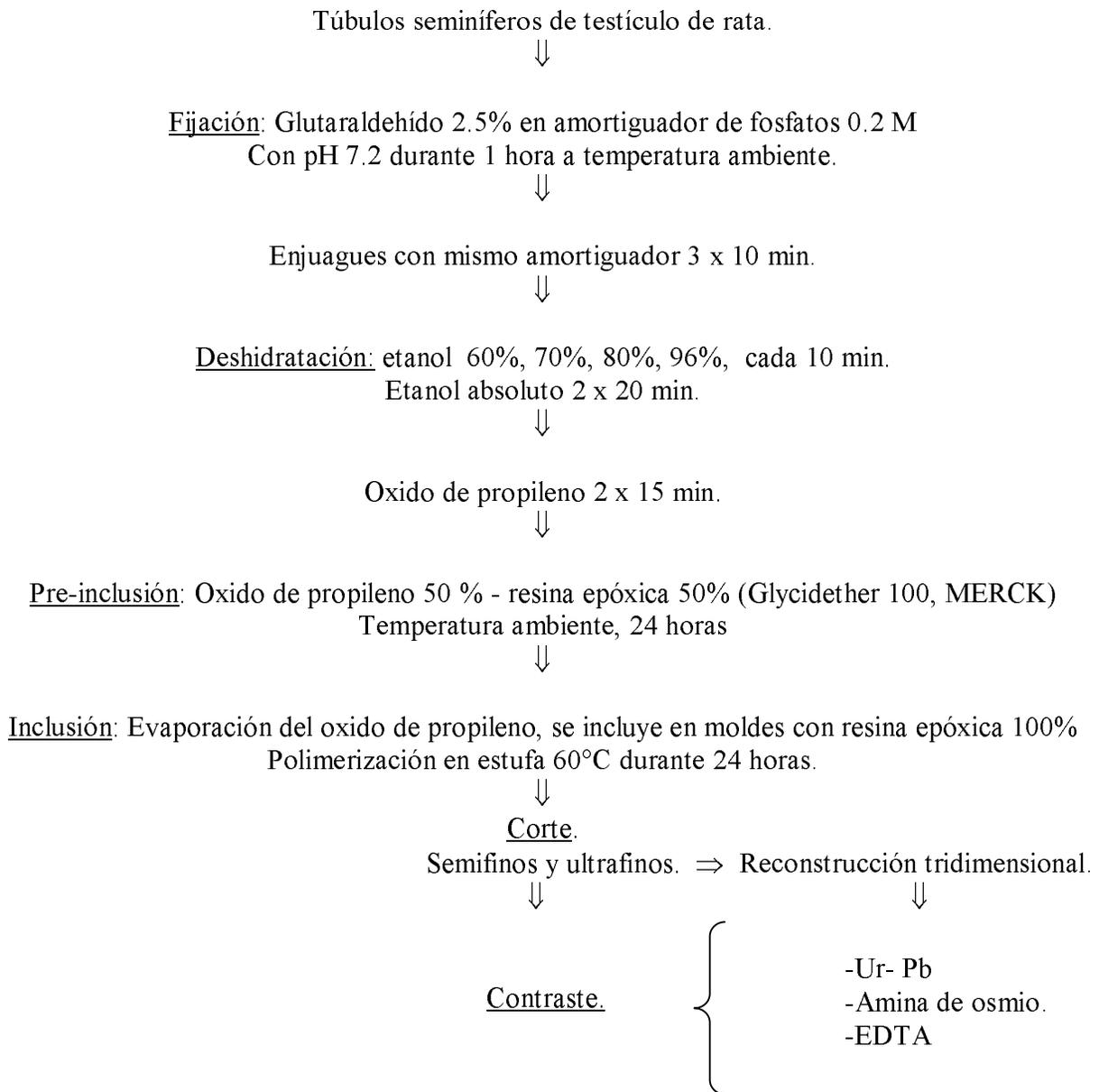


Diagrama de flujo 2. Procedimiento de tinción con amina de osmio.

Hidrolizar: HCl, 5N, 45 minutos a temperatura ambiente.



Lavado con H₂O destilada. X inmersión.



A-O, 1 hora, 37° C en oscuridad.



Lavado con H₂O destilada. X inmersión.



Secado con papel filtro

Análisis Inmunocitoquímico.

Inmunolocalización.-

Las técnicas inmunocitoquímicas se basan en la detección de antígenos mediante anticuerpos. Los antígenos son generalmente moléculas de alto peso molecular como las proteínas, los polisacáridos y ácidos nucleicos, exógenos a un animal, que al ser administrados a éste activan a los linfocitos, los que a través de un largo proceso producen anticuerpos específicos. La gran afinidad de los anticuerpos por su antígeno otorga especificidad a la reacción y disminuye el ruido de fondo, así como las reacciones cruzadas con otros componentes. En inmunocitoquímica, el anticuerpo se utiliza como un reactivo para localizar el antígeno contra el cual fue preparado y se aplica a una sección de la célula en la que interactúa con el antígeno, formando un complejo antígeno-anticuerpo.

Existen dos métodos para localizar antígenos: El primero es el directo, consiste en marcar el anticuerpo con un colorante o un enzima catalizadora. El segundo es el indirecto, que consiste en 2 pasos; el primer paso es la localización del antígeno de la célula por un anticuerpo (anticuerpo primario) no marcado, aplicado directamente. En el segundo paso se visualiza la reacción por un anticuerpo desarrollado contra el anticuerpo primario y unido a un marcador (anticuerpo secundario).

En microscopía electrónica los marcadores deben tener elementos de alto número atómico o combinarse con uno de ellos. Los marcadores más usados son miscelas de oro y la enzima peroxidasa, que cuando se le emplea en presencia de aminobencidina y peróxido de hidrógeno da un producto insoluble y osmiófilo.

Procedimiento.-

Se tomó una cantidad de túbulos seminíferos de un testículo de rata joven Wistar, se dividió en tres partes. El primer tercio de material fue fijado inmediatamente con paraformaldehído al 2 % en PBS como amortiguador, por 1 hora a 4° C. El segundo tercio fué fijado con paraformaldehído también pero al 1 % en PBS a temperatura ambiente y con 2 min. de microondas. El último tercio fue fijado igual que el anterior pero con 4 min. de microondas. Se lavó el material en PBS.

La deshidratación se llevó a cabo con soluciones de metanol en agua destilada al 30 %, 50 %, 70 % y 90 % aumentando el tiempo y bajando la temperatura. Para la preinclusión se utilizó metanol al 90 % y Lowicryl K4M en proporciones 1 : 1 por 60 min. a -20° C. Luego se realizó un cambio a proporción 1 : 2 respectivamente por 60 min. a -20° C. Posteriormente se dejó 1 hora en resina pura a la misma temperatura, para después hacer un cambio nuevamente a resina pura y dejar toda la noche. Al otro día se incluyó en cápsulas de gelatina y se polimerizó a -20° C con luz ultravioleta.

Se realizaron cortes semifinos de los bloques en resina K4M, se eligieron zonas de interés según las asociaciones celulares y se retalló la cara del bloque para obtener cortes ultra finos; se montaron en rejillas de níquel previamente cubiertas con formvar.

Se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-ADN de Progen, de acuerdo al protocolo de Vázquez-Nin *et al.* (1993).

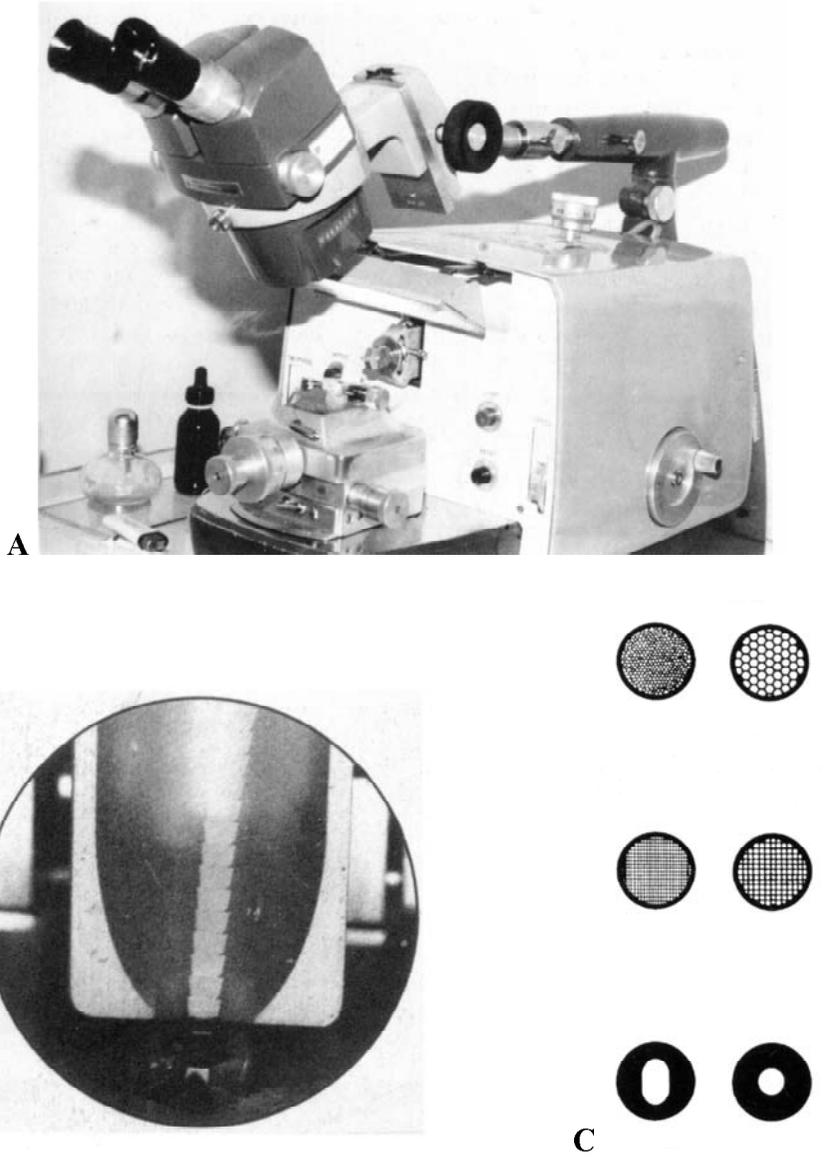


Figura 5. a) Ultra micrótomo MT-2. b) Cortes sostenidos por tensión superficial sobre el agua que contiene la barquilla de una cuchilla de diamante. La cinta que se forma por adherencia de un corte con el siguiente, facilita recogerlos ordenadamente con el fin de reconstruir la tercera dimensión de estructuras mediante cortes seriados. c) Soportes de las muestras para su estudio con el microscopio electrónico de transmisión, también llamados rejillas. Todos los discos son de 3 mm de diámetro (Vázquez-Nin y Echeverría, 2000).

Diagrama de flujo 3. Procedimiento de material biológico para Lowicryl K4M

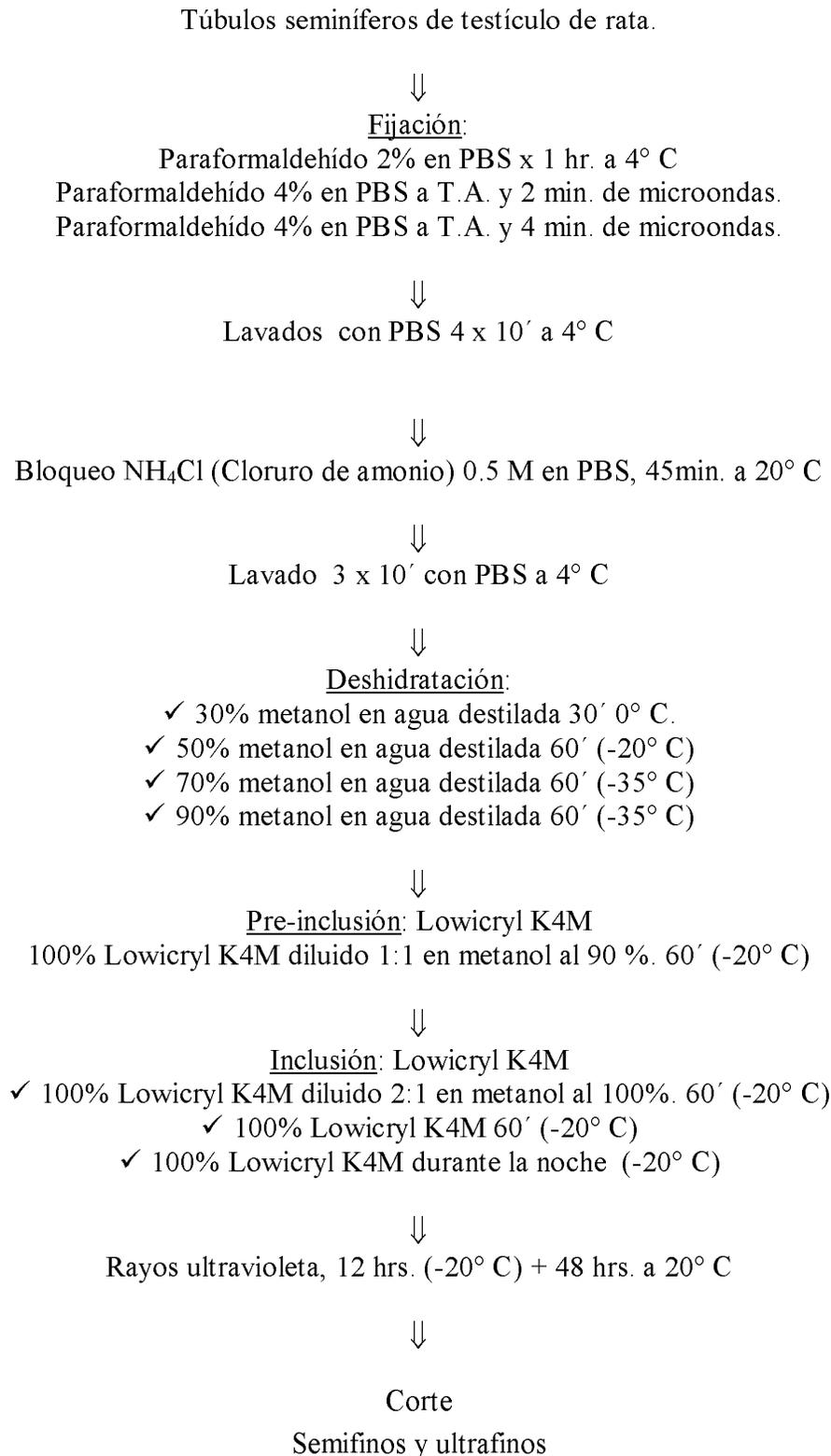


Diagrama de flujo 4
Procedimiento de inmunolocalización post-inclusión con segundo anticuerpo marcado con oro.

Los cortes de testículo montados en rejillas de níquel se ponen sobre una gota de suero normal de cabra (NGS) diluido 1:100 en PBS 3 min.



Se flota en una gota de solución: 10 ml. de PBS + 1 mg albúmina de suero bovino (BSA) + 5 µl de Tween 20 + anti-ADN 1:10, a T. A. 4 horas.



Se incuba 16 hr. en gotas de 10 a 40 µl sobre Parafilm en una cámara húmeda a 4° C.



Lavados con PBS-Tween 20 por goteo.



Lavados con PBS sólo por goteo



Se flota 15 min. en PBS solo.



Se flota 3 min. en NGS en PBS 1:100.



Incubamos en el 2° anticuerpo GAM-IgM oro de 10 nm diluido 1:10 en PBS en gotas de 10 a 40 µl sobre Parafilm en una cámara húmeda 30 a 60 min. a T. A.



Lavar con PBS por goteo, flotar en PBS 15 min. Lavado nuevamente con PBS por goteo.



Lavado con H₂O bidestilada por goteo y flotar 15 minutos en H₂O bidestilada.



Se deja secar medio día antes del contraste suave.
EDTA, Ur-Pb.

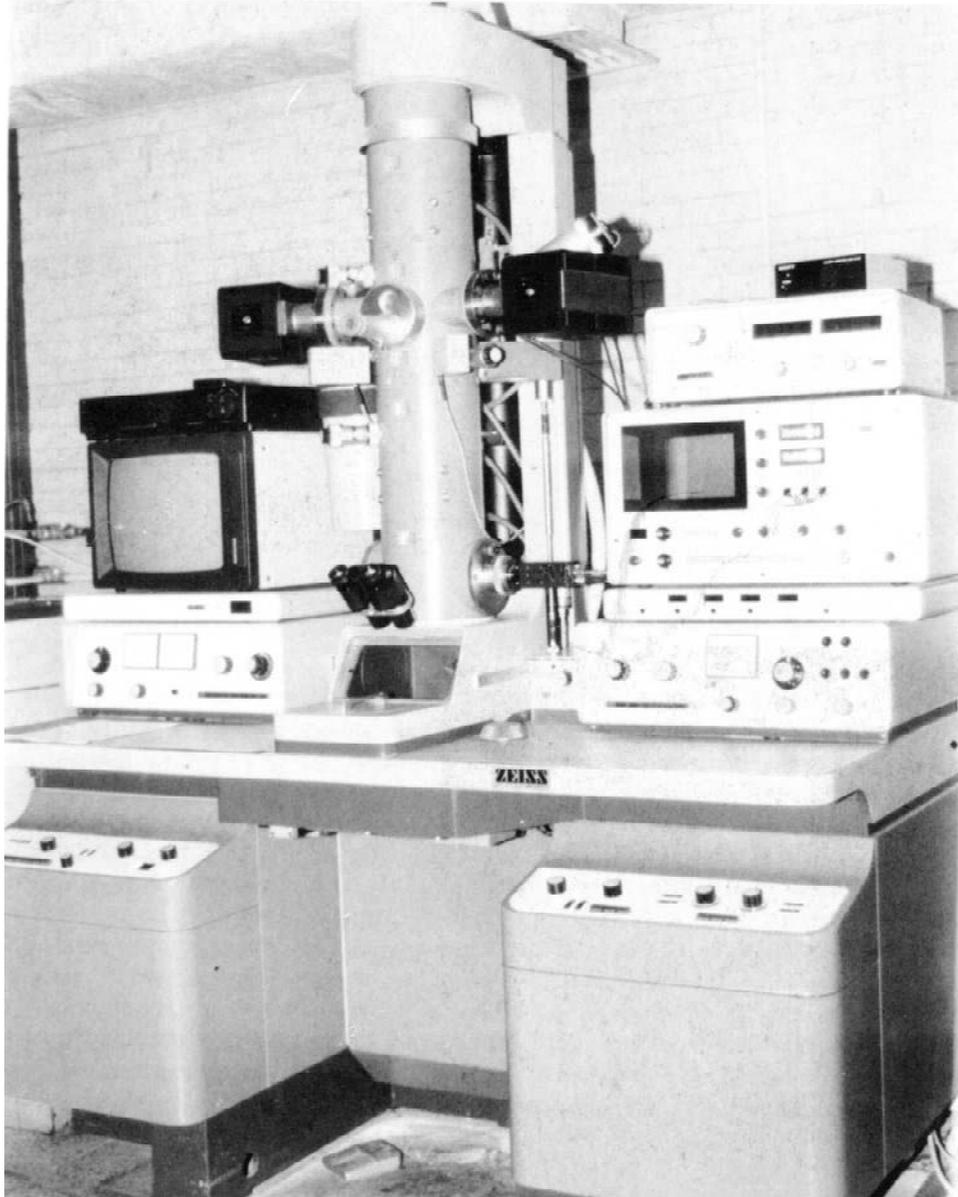


Figura 6. Microscopio electrónico de transmisión EM10 Carl Zeiss del laboratorio de microscopía electrónica de la facultad de ciencias. (Vázquez-Nin y Echeverría, 2000).

RESULTADOS

El núcleo de espermatogonias tipo "B".

El núcleo presentó además de los componentes estructurales que normalmente encontramos en núcleos interfásicos, ejes alargados irregulares en forma de collar de cuentas, compuesto de cromatina extendida alternándose con cromatina parcialmente condensada, y al mismo tiempo presentó asociación de partículas ribonucleoproteicas, se generan a partir de cúmulos de cromatina compacta junto a la envoltura nuclear y pueden llegar a medir hasta un radio nuclear.

Además, estos núcleos presentan otros ejes largos de cromatina extendida rodeados por filamentos o asas laterales y su estructura se asemeja a los cromosomas plumulados de los anfibios; sin embargo, son unas 100 veces más pequeños por lo que los llamamos estructuras microplumuladas (Fig. 7).

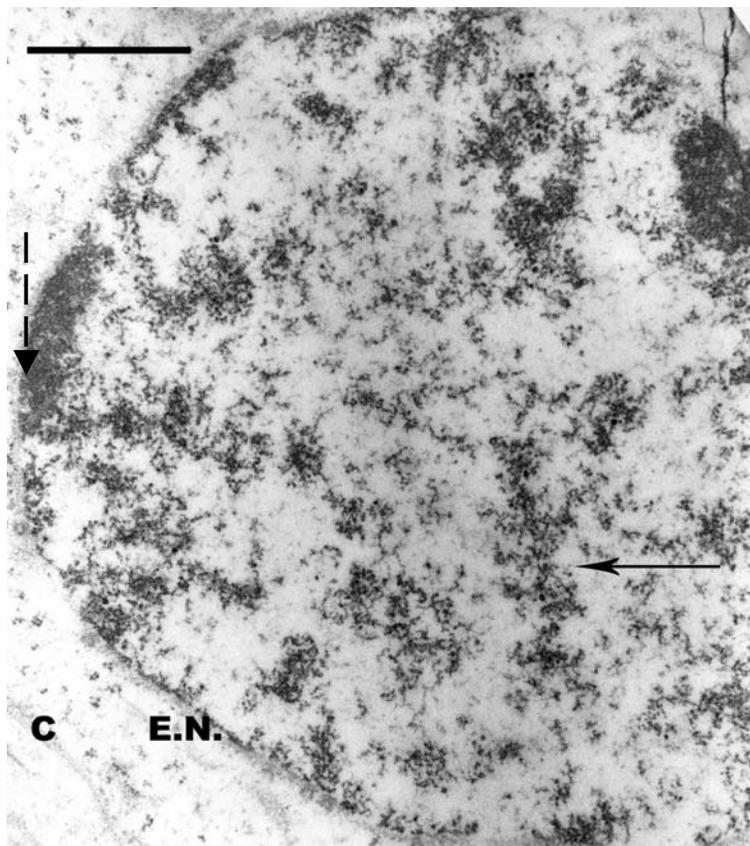


Figura 7. Núcleo de espermatogonia de testículo de rata. Tinción general. Flecha grande: estructura microplumulada en la que se observan las asas laterales en forma perpendicular al eje principal de la estructura microplumulada, la cual llega a tener la longitud de un radio nuclear. La flecha punteada nos muestra la alternancia de cromatina laxa y semicompacta en forma de cuentas de collar que parte de un cúmulo de cromatina compacta adosado a la envoltura nuclear, típica de espermatogonias costrosas. C = citoplasma. E.N. = envoltura nuclear. Aumento 22,250 x.

Barra = 1 micra.

Estos ejes pueden partir del collar de cuentas o también de cúmulos de cromatina compacta que se encuentran en contacto con la envoltura nuclear y llegan a medir la mitad del diámetro nuclear. Algunos se alinean en paralelo a lo largo, frecuentemente son encontrados con esta disposición en cortes seriados, pueden ocupar bastante espacio nuclear o tan solo presentarse en un corte.

Las estructuras cromosómicas microplumuladas son observables en espermatogonia tipo "B" (en espermatogonias tempranas no) y posteriormente en espermatocitos tempranos (pre-leptoteno, leptoteno, zigoteno).

Estas evidencias demostraron una decompactación de la cromatina previa al pre-leptoteno.

Gracias a la tinción específica del ADN por amina-osmio se observó la presencia de las estructuras microplumuladas que están formadas por cromatina extendida (Fig. 8).

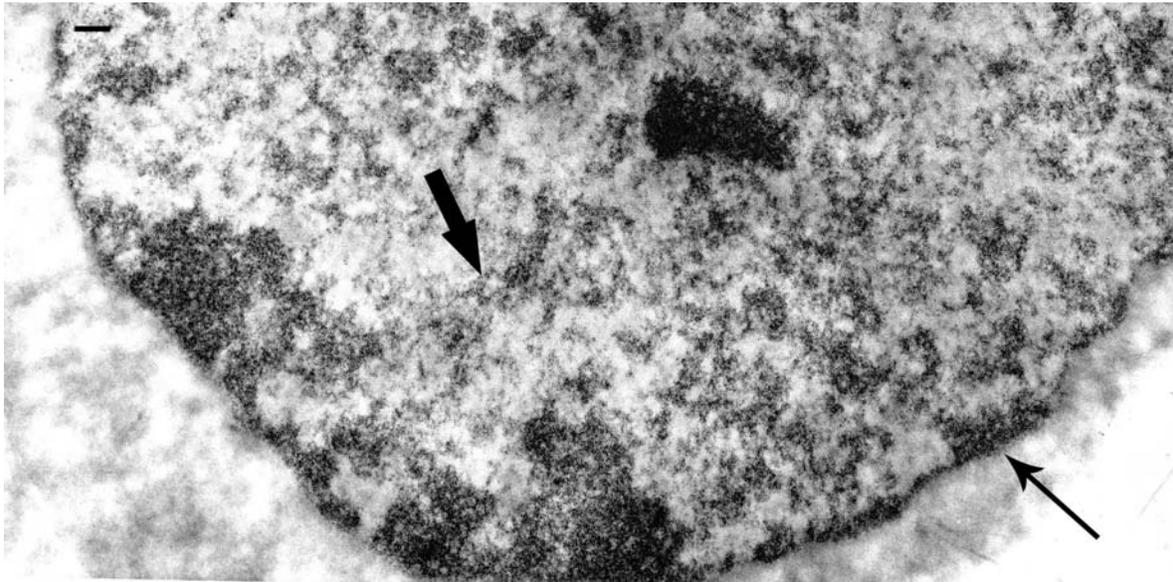


Figura 8. Núcleo de espermatogonia. Tinción amina-osmio. La flecha delgada señala una estructura microplumulada cromosómica que se encuentra alineada con otra a una distancia mayor de 100 nm, lo que nos demuestra que existe un reconocimiento de secuencias homólogas. En la flecha gruesa se observa cromatina extendida, así como cromatina compacta adosada a la envoltura nuclear, típica de espermatogonias tipo "b", de la cual se extiende en fibras a lo largo de un eje principal semejante a un collar de cuentas. Aumento: 38,750 x. Barra =100 nm.

El método de tinción preferencial para ribonucleoproteínas de Bernhard (acetato de uranilo - EDTA - citrato de plomo) corroboró que las estructuras microplumuladas formadas por cromatina laxa, presentan asociación con ribonucleoproteínas en forma de fibra o grano. El microplumulado sintetiza ARN mensajero.

Gracias a los cortes seriados, observamos que las espermatogonias tipo "B" contienen frecuentemente pares de estructuras en proceso de alineación, con dos ejes que se extienden paralelamente uno junto al otro; son estructuras microplumuladas que nacen a partir de cúmulos de cromatina compacta, cuyos ejes están formados generalmente por dos filamentos finos que contienen ADN, situados a una distancia entre 10 a 20 nm, relacionados por filamentos constituidos por ADN. Tanto los ejes como los filamentos transversales que los unen se asocian con fibrillas que contienen ribonucleoproteínas (Fig. 9).

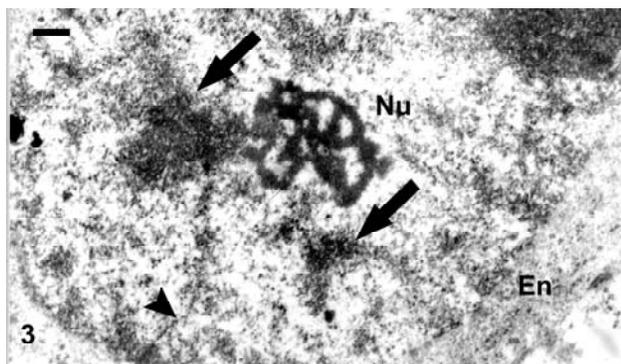
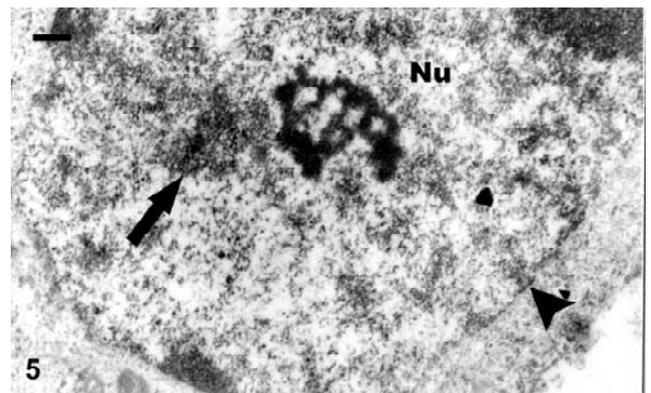
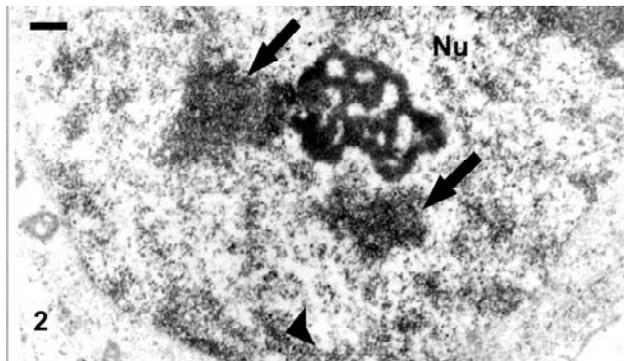
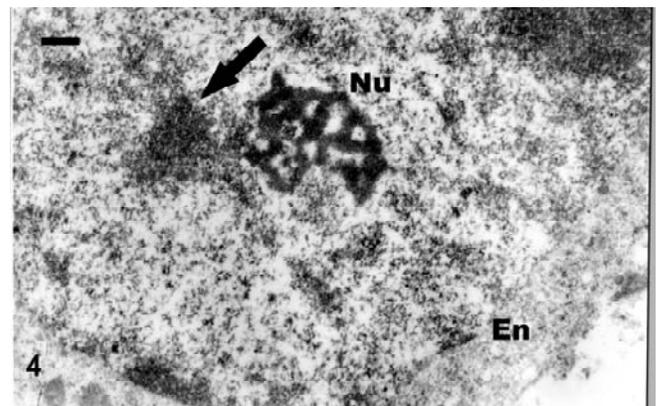
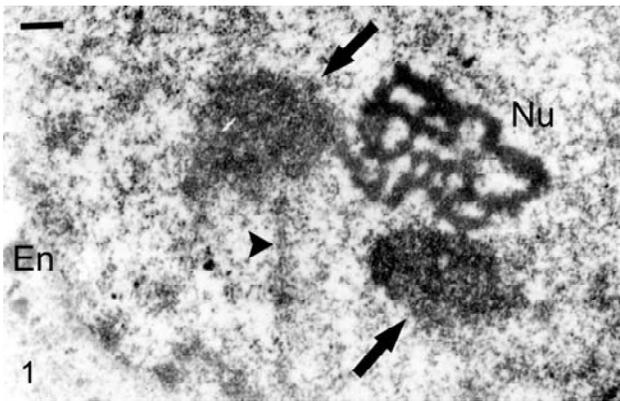


Figura 9.

Figura 9. Cortes seriados de núcleo de espermatogonia tipo "B". En la fotografía del primer corte, se observan 2 cúmulos de cromatina compacta (flechas) junto al nucleolo (Nu). Se visualiza un corte longitudinal del eje de la estructura microplumulada, (cabeza de flecha) que parte del cúmulo más grande hacia la envoltura nuclear (En) pero sin llegar a ella; mide entre 400 y 600 nm de largo en el corte; este eje consta de dos filamentos de ADN que corren paralelamente a una distancia entre 10 y 20 nm. Presenta asas radiales, transversalmente a lo largo de los ejes principales.

En el segundo corte se observa uno de los filamentos del microplumulado (cabeza de flecha) que se extiende un poco más, dando vuelta hacia la derecha; se observa con mayor densidad de ADN y/o ARN. Los cúmulos de cromatina compacta (flechas) disminuyen de tamaño en este corte así como el nucleolo (Nu).

En el corte 3 del núcleo, observamos el otro filamento del microplumulado (cabeza de flecha) pero extendiéndose hacia el lado izquierdo llegando hasta la envoltura nuclear, lo que demuestra que en esta fase del proceso meiótico, tenemos la formación de estructuras microplumuladas alineadas en paralelo, en ciertas partes del cromosoma. El nucleolo (Nu) disminuye su tamaño por el acercamiento del corte hacia la orilla de la estructura. Se observan dos cúmulos de cromatina compacta (flechas) que disminuyen su tamaño, uno casi desaparece.

El corte número cuatro muestra un cúmulo de cromatina compacta; el otro ya no aparece y en su lugar tenemos cromatina laxa, el nucleolo disminuye de tamaño.

En la quinta figura se aprecia dentro del núcleo que la mayoría del material se encuentra en estado laxo, salvo algunos cúmulos pequeños de cromatina compacta (flecha) y algunos segmentos de alineaciones no muy claras como la que esta señalada por la punta de flecha.

Aumento: 17000 x. Barra = 200 nm.

El núcleo en interfase meiótica.

Esta fase también llamada pre-leptoteno, se caracteriza por la pérdida de los cúmulos de cromatina compacta en contacto con la envoltura nuclear; progresivamente van extendiéndose y el nucleolo migra hacia la periferia disminuyendo su tamaño.

La estructura microplumulada tiene un eje principal llamado filamento axial que se observa en el recuadro de la figura 10 y en la figura 11; además está compuesto por dos filamentos finos de cromatina, con una distancia entre ellos de 10-20 nm aproximadamente, en el cual crecen asas radiales en forma de ramas de cromatina, pareciendo un árbol de Navidad. Estas asas de cromatina laxa tienen 40 a 200 nm de longitud, medido del extremo al filamento axial. En su formación son poco numerosas, su frecuencia aumenta gradualmente y se distribuyen a lo largo del filamento axial.

Las asas radiales antes mencionadas se asocian con ribonucleoproteínas (Fig. 10); estas partículas parecen estar involucradas en el reconocimiento y alineamiento de los cromosomas homólogos.

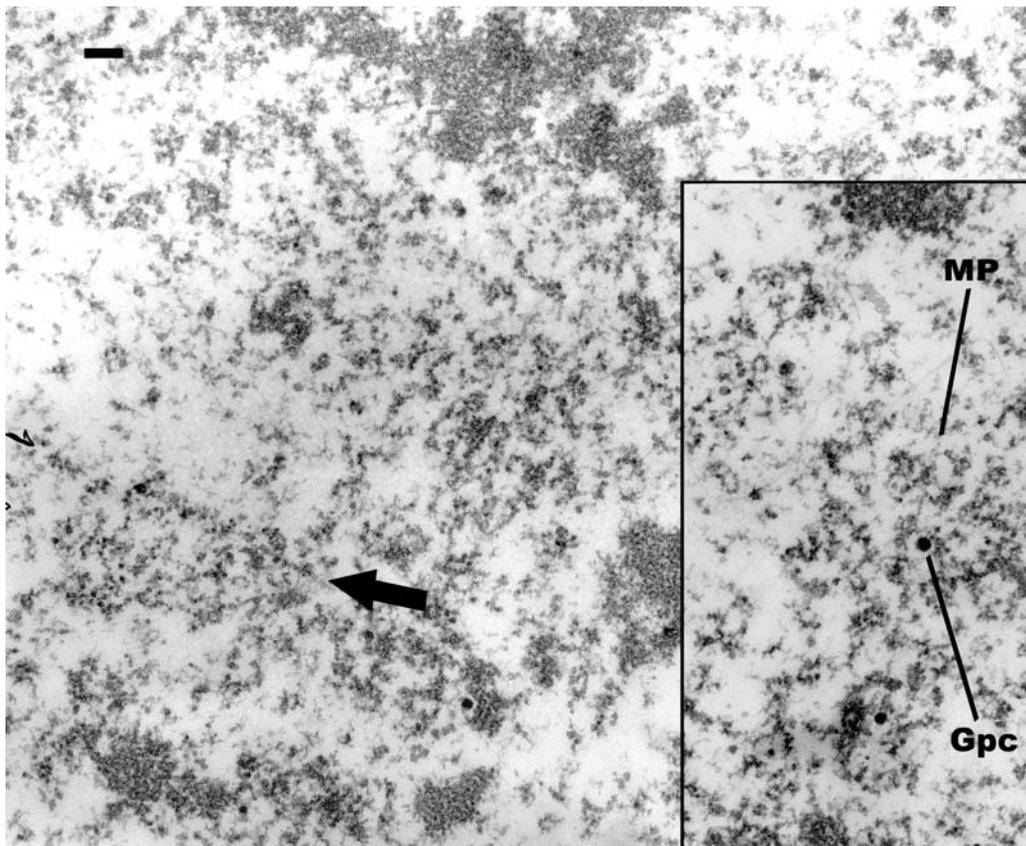


Figura 10. Dos regiones de cromosomas homólogos forman a la estructura de escalerilla de doble cuerda (flecha), la cual podemos encontrar en estadio pre-leptoteno o interfase meiótica, como es el caso de esta imagen donde se distinguen dos ejes paralelos que están conectados entre sí por fibrillas tanto de ARN como ADN; incluso se hace notar el gránulo pericromatiniano. Tinción general. Aumento 52,500 x. Barra =100 nm.

Recuadro. Estructura microplumulada (MP) asociada con partículas RNP, gránulos pericromatinianos (Gpc). Tinción general. Aumento 52,500 x.

Comúnmente, pares de microplumulados se encuentran alineados en paralelo y conectados por filamentos de ADN asociados con fibras de ribonucleoproteínas (Fig. 11). Esta estructura en proceso de ensamblaje la denominamos escalerillas de doble cuerda. La distancia entre los filamentos axiales del microplumulado puede ser agrupada en dos rangos: 40 a 100 nm, filamentos yuxtapuestos y de 150 a 300 nm, filamentos axiales alineados a distancia. En el estadio pre-leptoténico, se observan claramente los pares de filamentos paralelos de cromatina extendida, interrelacionada por filamentos finos y estructuras en forma de cuentas de rosario, las cuales corresponden a fibras de ribonucleoproteínas, lo que nos hace deducir que persiste el nivel alto de transcripción en el núcleo.

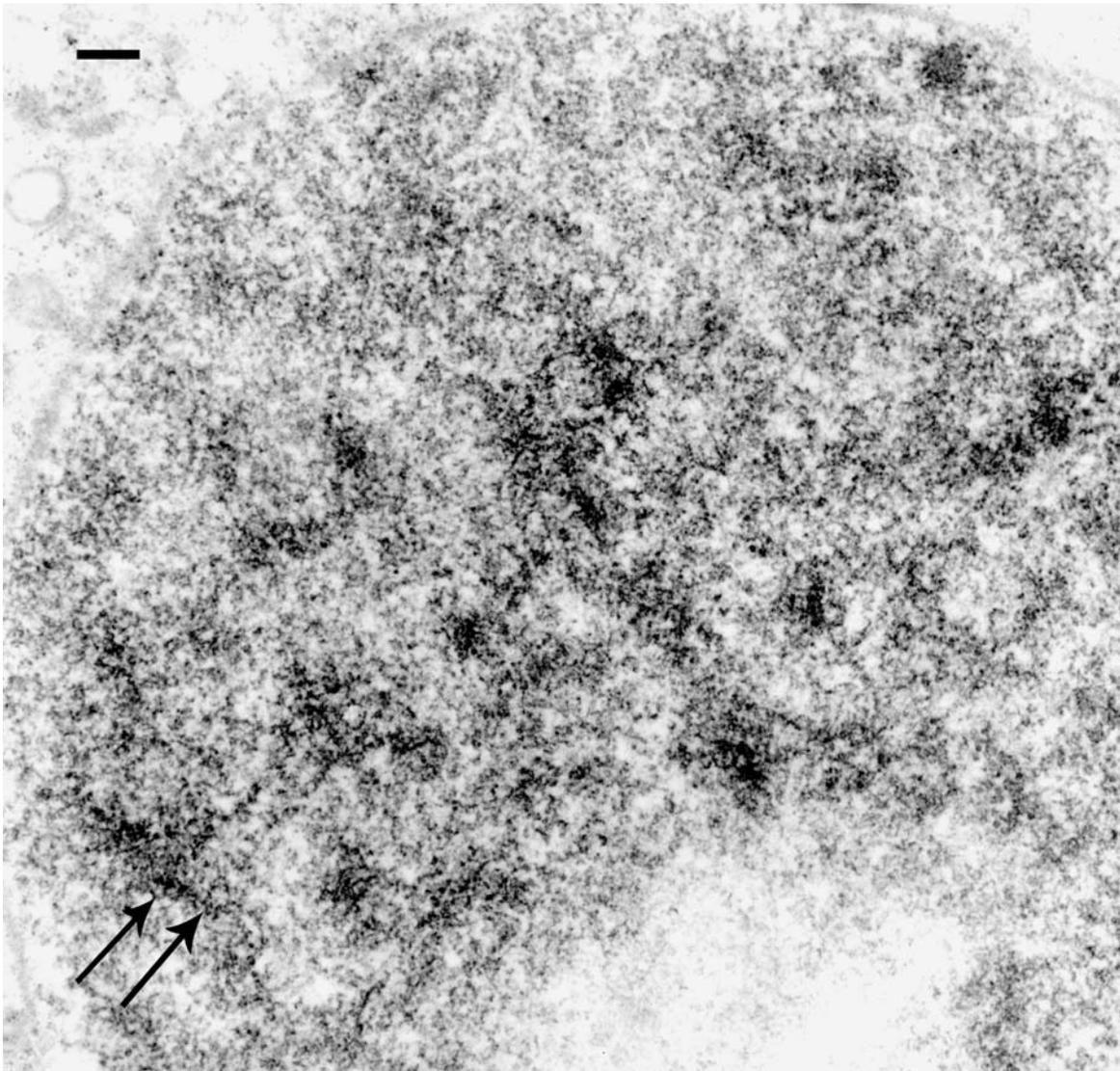


Figura 11. Núcleo en interfase meiótica, inicio de leptoteno-zigoteno. Tinción general. Las flechas señalan dos microplumulados en el proceso de apareamiento, formando ya una estructura llamada escalerilla de doble cuerda. Los filamentos alineados en paralelo se unen por filamentos transversales. Observe la falta de cromatina compacta y de gránulos pericromatinianos. Gran cantidad de euromatina en el nucléoplasma. Aumento 33,750 x. Barra =200 nm.

Al final de la interfase meiótica la cromatina extendida y las estructuras RNP en el espacio nuclear sugieren transcripción (Fig. 10 y 11). Observamos estructuras micropilumuladas asociadas a partículas ribonucleoproteicas.

Estadio leptoteno - zigoteno (Fig. 12).

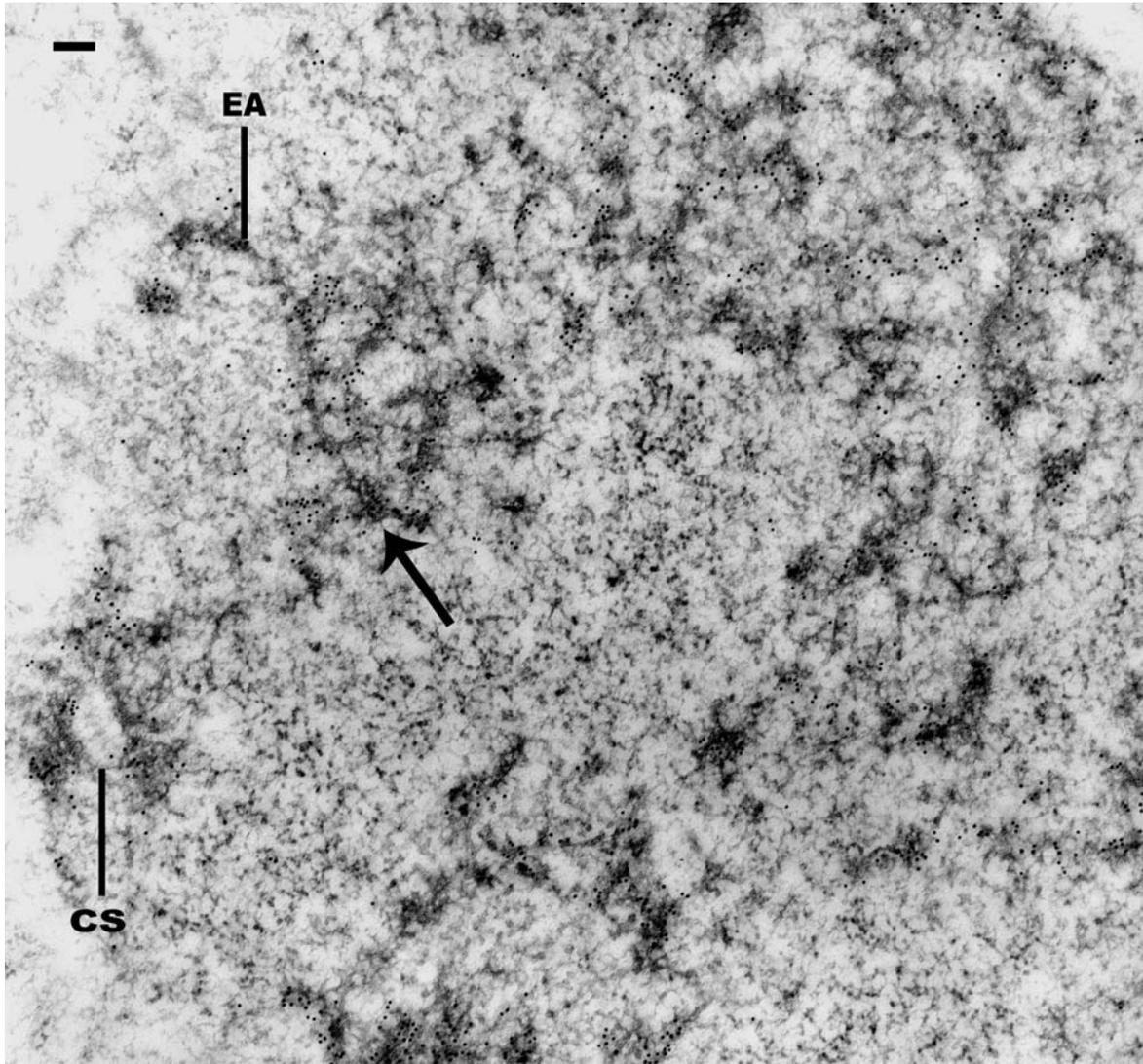


Figura 12. Tinción general. Anticuerpo específico para ADN acoplado a miscelas de oro de 10 nm. Estadio leptoteno-zigoteno de la profase meiótica I. Se ven partes de complejos sinaptonémicos (CS), uno de ellos en formación (flecha), así como ejes axiales (EA) que contienen ADN, que convergen y forman la sinapsis de los cromosomas homólogos por medio de diminutas fibras que atraviesan de un elemento lateral a otro. Aumento 52,500 x. Barra =100 nm.

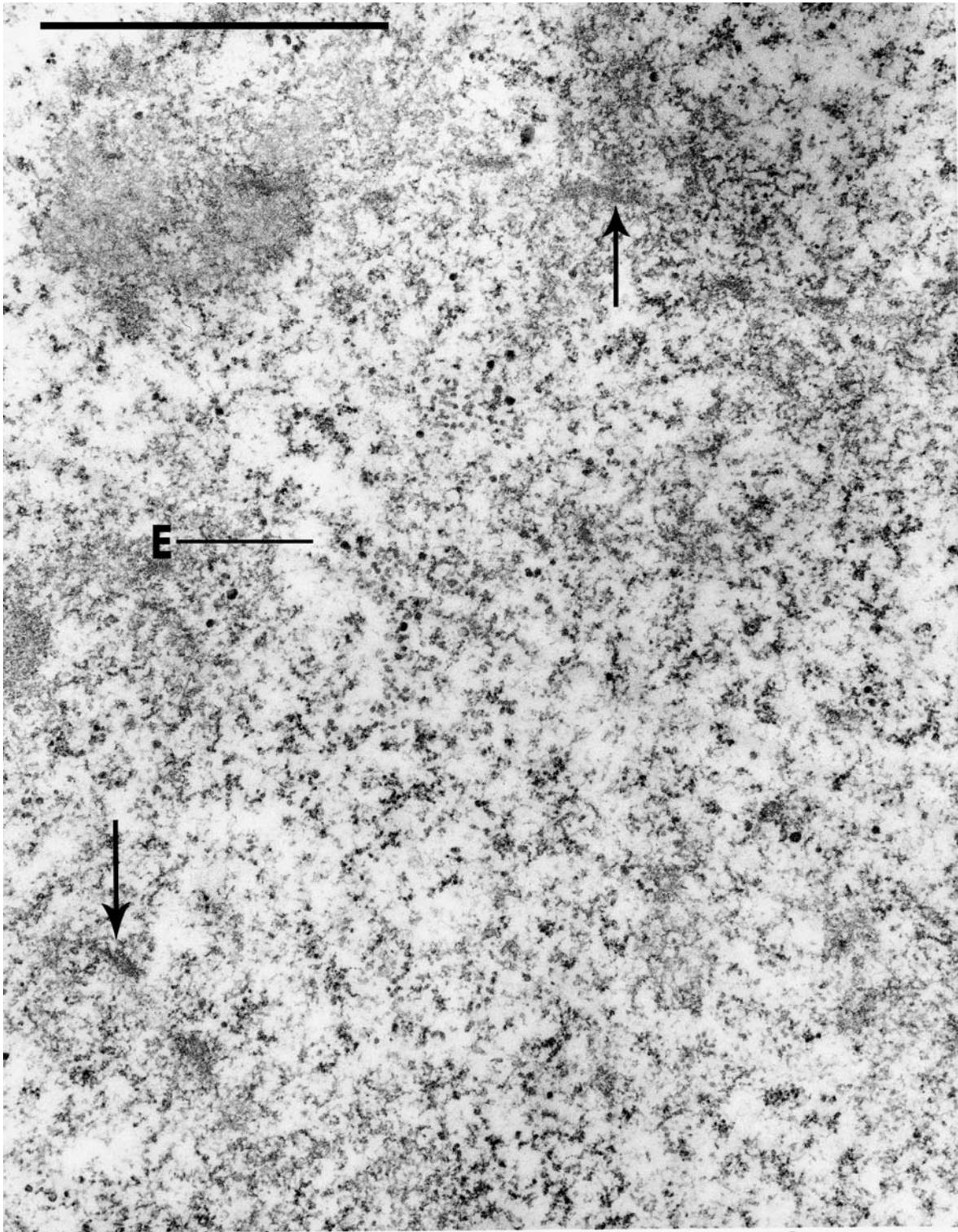


Figura 13. Núcleo de espermatocito de rata. (Leptoteno-zigoteno). Tinción preferencial para ribonucleoproteínas. Se observan elementos laterales de complejos sinaptonémicos en formación, marcados por flechas. Escalerillas de doble cuerda (E) formada por dos ejes en disposición paralela de partículas ribonucleoproteicas. Aumento 38750 x. Barra =1 micra.

En el estadio leptoteno y zigoteno observamos también una alta producción de partículas ribonucleoproteicas, las cuales están asociadas a las escalerillas de doble cuerda. Por otro lado, corroboramos que el elemento lateral está formado en su mayoría por estas partículas EDTA positivas que se asocian con las asas de cromatina (Fig. 13 y 14)

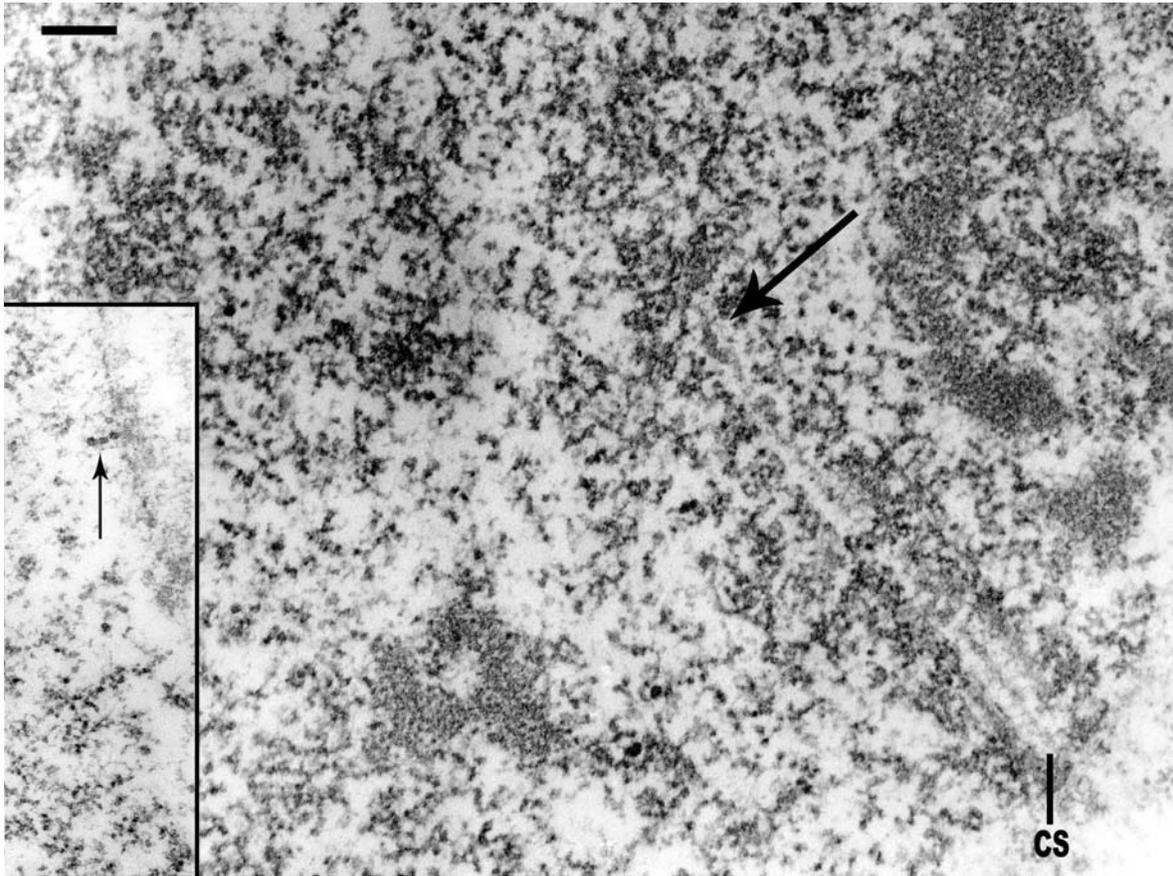


Foto 14. Núcleo en leptoteno-zigoteno avanzado donde se señala el complejo sinaptonémico (CS) ya formado, así como la continuidad con la estructura de escalerilla de doble cuerda (flecha grande), relacionándose con pequeñas fibras de cromatina y RNPs. Tinción general. Aumento 52 500 x. Barra =190 nm.

Recuadro: Se observa la asociación de las asas radiales de una estructura microplumulada con gránulos y fibras pericromatinianas señaladas con flecha pequeña. Tinción preferencial para RNPs (EDTA). Aumento 52500 x.

En el estadio leptoteno-zigoteno muchos de los cromosomas ya están alineados al comienzo de la formación del elemento axial. Al inicio de este período, los filamentos axiales de los microplumulados presentan regiones densas, generalmente cortas, discontinuas y muchas de ellas aparecen en pares, en contacto con la envoltura nuclear. El incremento de densidad está dado por un material que se asocia al filamento axial. Este material no se contrasta con amina-osmio, tinción específica para ADN.

Con el procedimiento de tinción preferencial para ribonucleoproteínas, se contrastan positivamente los elementos axiales nacientes (Fig. 15).

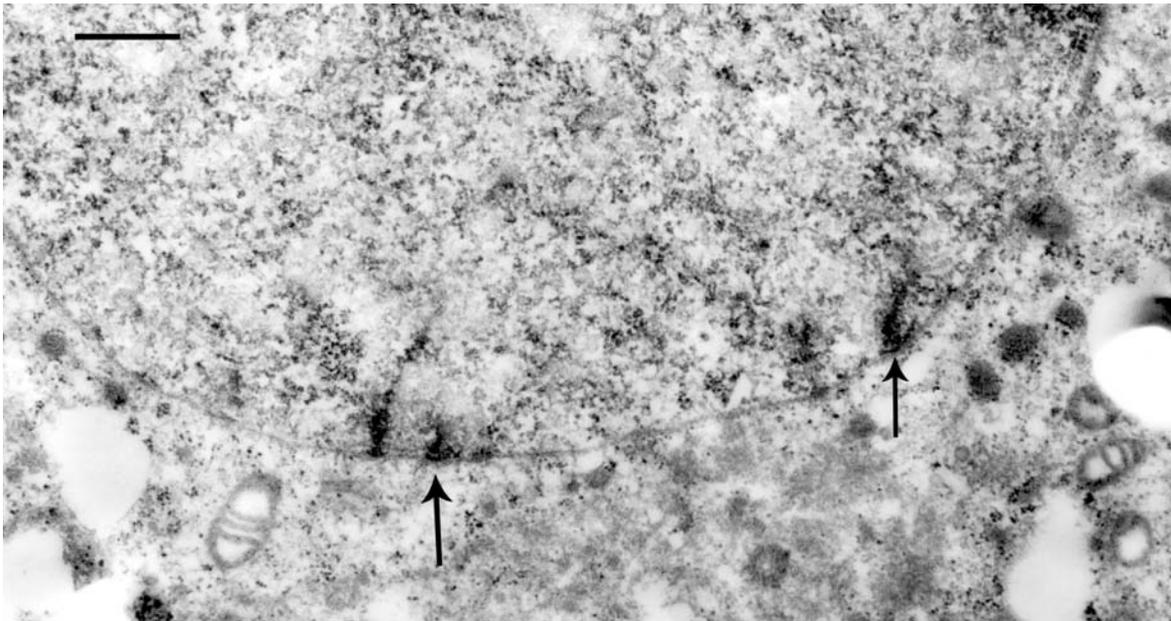


Figura 15. Núcleo de espermatocito de rata en estadio leptoteno-zigoteno medio. Tinción preferencial para RNPs (EDTA). Ejes axiales formándose ya apareados conservando su estructura preexistente, es decir, la estructura microplumulada que sufre un engrosamiento del eje por la acumulación de proteínas, así como filamentos pequeños transversales EDTA positivos señalados con flechas. Aumento 13600 X. Barra = 1 micra.

Cada elemento axial está compuesto por dos filamentos paralelos muy cercanos entre sí, de 20-30 nm de separación. Los elementos axiales pueden comenzar a formarse alineados a distancia, variando entre 150 y 700 nm, con numerosos filamentos transversos en el espacio entre ellos. Esta formación se da a la par con la alineación de estructuras microplumuladas, es decir con la formación de escalerillas de doble cuerda.

La continuidad de estructuras microplumuladas y de elementos axiales nacientes que conservan la estructura plumulada se observa frecuentemente.

Las reconstrucciones tridimensionales muestran que los elementos axiales se forman en pares en continuidad con estructuras microplumuladas conectadas por fibras transversales. También se encuentran elementos axiales cortos y aislados, que presentan una estructura cilíndrica de 35 a 55 nm de diámetro. Los pares de elementos axiales se acercan en la proximidad de la envoltura nuclear (180-350 nm) pero divergen en el interior del núcleo (400-800 nm), se puede observar en la figura 15.

Existe una intensa transcripción en leptoteno - zigoteno. Las estructuras EDTA positivas más abundantes que presentan ARN son las fibras de ribonucleoproteínas; también existen algunos gránulos pericromatinianos nacientes y gránulos intercromatinianos dispersos o en pequeños cúmulos (Fig. 13,14 y 15).

El espacio entre los elementos axiales alineados antes de la sinapsis tiene una estructura en forma de puente, por numerosos hilos finos de cromatina asociados con fibras de ribonucleoproteínas y gránulos. La distancia más cercana entre ambos elementos llega a ser entre 50 y 90 nm, la cual es menor que la distancia entre los elementos laterales del CS.

El elemento central y filamentos transversos del CS aparecen progresivamente entre los elementos laterales creando una región libre de cromatina y ribonucleoproteínas. La aparición de esta región central de exclusión de cromatina es el rasgo distintivo del inicio de la sinapsis (Fig. 12 y 14).

Existe un proceso de compactación y al mismo tiempo de reorganización espacial de la cromatina. El CS naciente es rodeado por capas de cromatina compacta asociada con los elementos laterales. Los filamentos radiales de cromatina extendida son asas de ADN cortas que con frecuencia están contenidas en el grosor del corte. Se forman también algunos cúmulos de cromatina compacta asociados a la envoltura nuclear.

Es muy raro observar convergencias de elementos axiales durante la sinapsis, por que estas estructuras están cerca una a la otra, y ya están paralelos cuando se forma el CS. Cuando se forma el bouquet los elementos axiales no apareados, así como los CS en formación se acercan unos a otros, debido al desplazamiento de los telomeros, se concentran en una pequeña superficie de la envoltura nuclear. En la figura 16 se ve el tamaño del elemento axial que varía entre 350 nm y 1.5 μm . Algunos llegan a ser de varias micras de longitud.

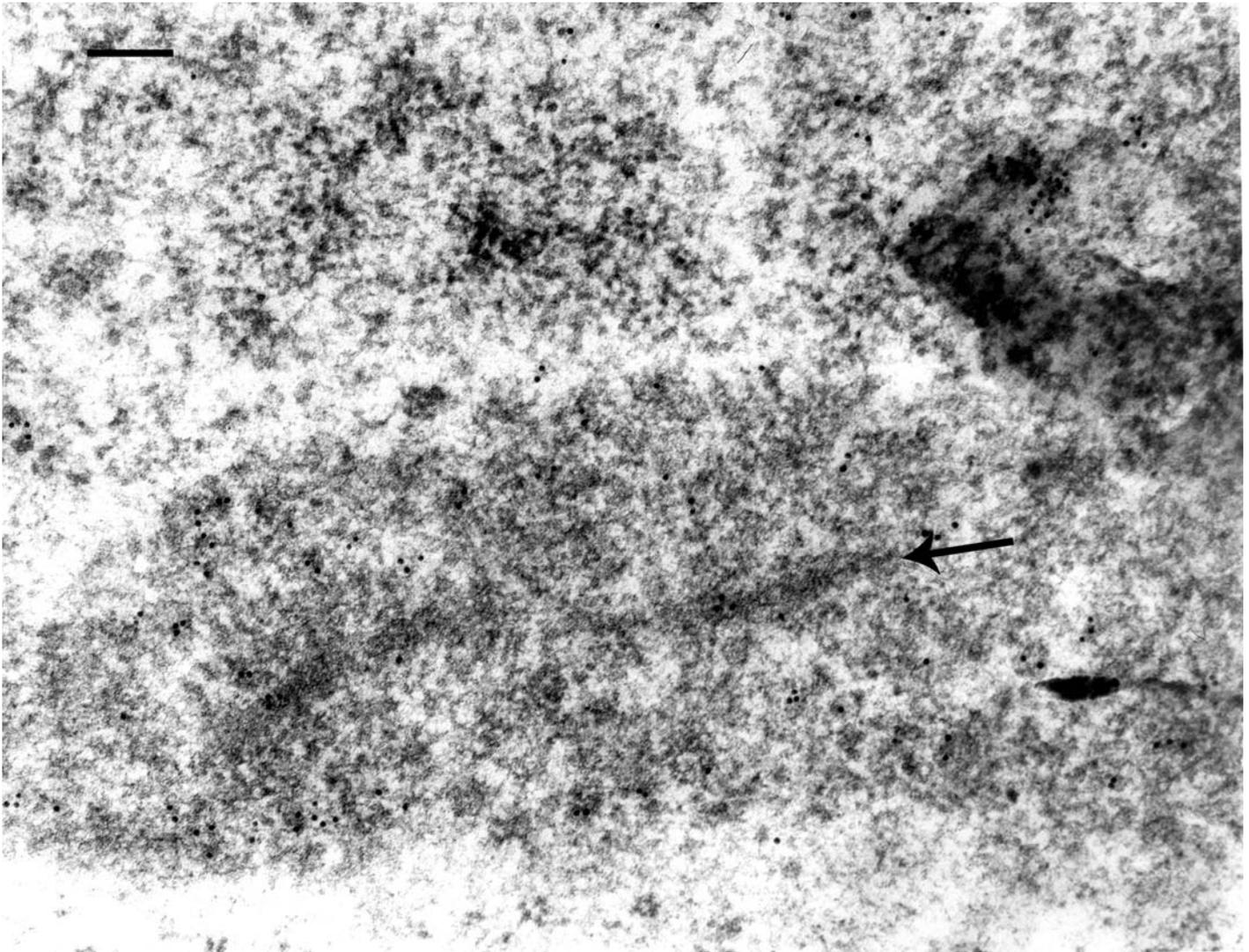


Figura 16. Eje axial. Tinción UrPb e inmunolocalización con anti-ADN acoplado a miscelas de oro de 10 nm. Se observa el filamento axial así como las extensas asas de cromatina con presencia de granos de oro. Esta estructura también presenta asociación con partículas ribonucleoproteicas, Aumento 95000 x. Barra =100 nm.

Estadio paquitenio.

Este estadio se caracteriza por la presencia de CS completamente formados, donde los elementos laterales presentan estrías transversales cada 200 nm aproximadamente en cortes laterales y oblicuos del CS, como en la figura 17. En estos cortes también se observa que los elementos laterales del CS en paquitenio son cintas de 0.2 μm de ancho, con estrías longitudinales formadas por paquetes gruesos irregulares de fibras que se extienden a lo largo de la cinta.

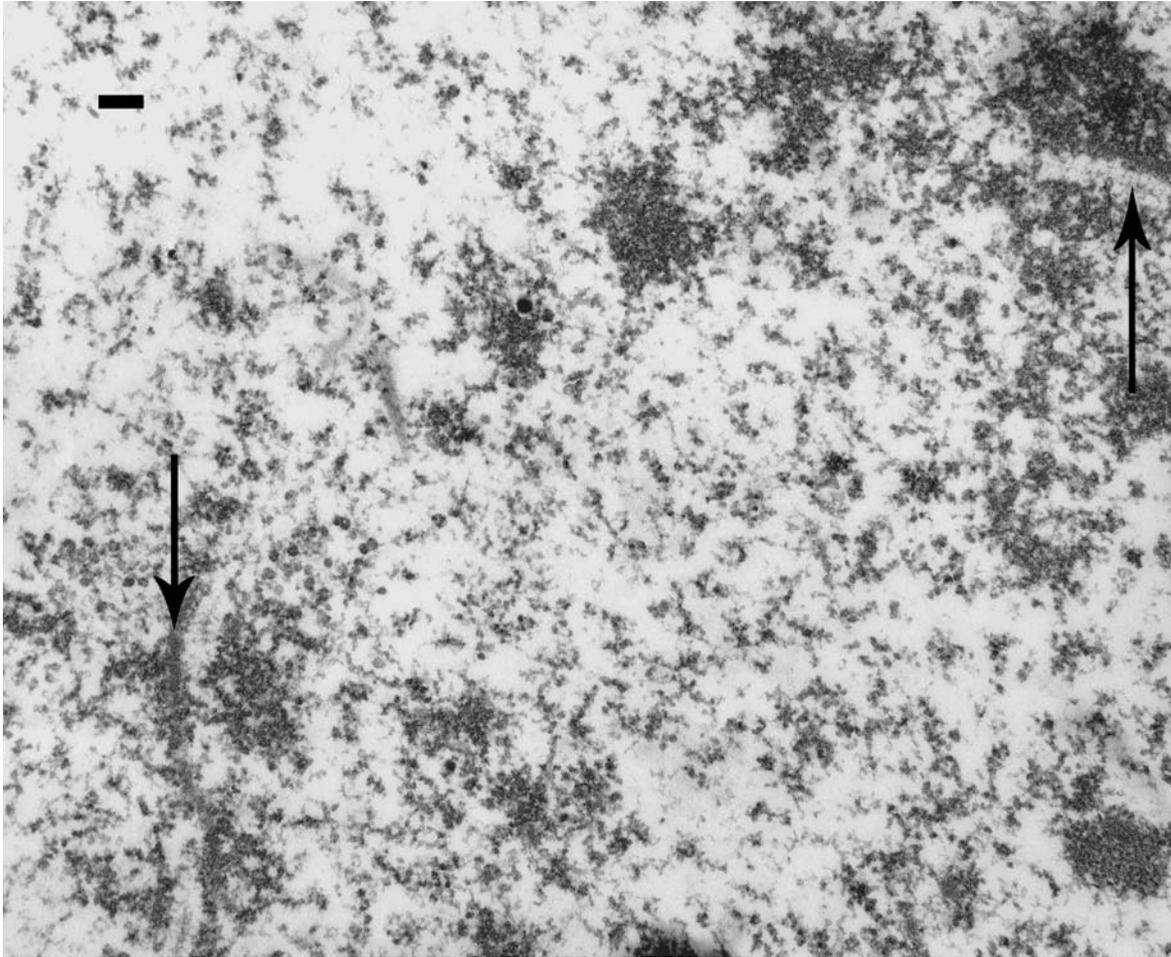


Figura 17. Complejos sinaptonémicos maduros, en los que se observan los diferentes componentes de la estructura tripartita. La flecha superior muestra los filamentos transversos y el elemento medial. La flecha inferior muestra los elementos laterales y sus estrías transversales. Tinción general. Aumento 52500 x.
Barra = 100 nm.

En la cara central del elemento lateral existen uno o dos filamentos teñidos en oscuro de grosor irregular pareciendo un collar de cuentas en una cinta o cuerda alineadas. Por su delgadez y composición estos filamentos son difíciles de observar si no se emplean contrastes específicos o preferenciales para ADN o ARN.

El acetato de uranilo - EDTA - citrato de plomo, procedimiento de tinción preferencial para RNP (Bernhard, 1969), contrasta positivamente numerosas fibras y gránulos asociados con la estructura microplumulada: además del elemento axial en proceso de formación, el desarrollo de ejes cromosómicos durante leptoteno - zigoteno y el elemento lateral del CS en paquiteno temprano así como fibras y gránulos en el nucleoplasma (Fig. 18).

Conforme avanza el paquiteno el elemento lateral del CS contiene menos RNPs y por lo tanto disminuye el contraste en su estructura, pero alrededor del CS se tiñen numerosas fibras y gránulos pericromatinianos descritas por Monneron y Bernhard en 1969.

La mayor cantidad de gránulos pericromatinianos en la profase meiótica I, se observa en el paquiteno y en estadios posteriores, pues en la interfase meiótica y leptoteno-zigoteno son escasos.

En la figura 18, se observa un corte lateral del elemento lateral del CS contrastado con la técnica del EDTA. Esta tinción pone de manifiesto gránulos pericromatinianos y fibras ribonucleoproteicas asociadas a dicho elemento.

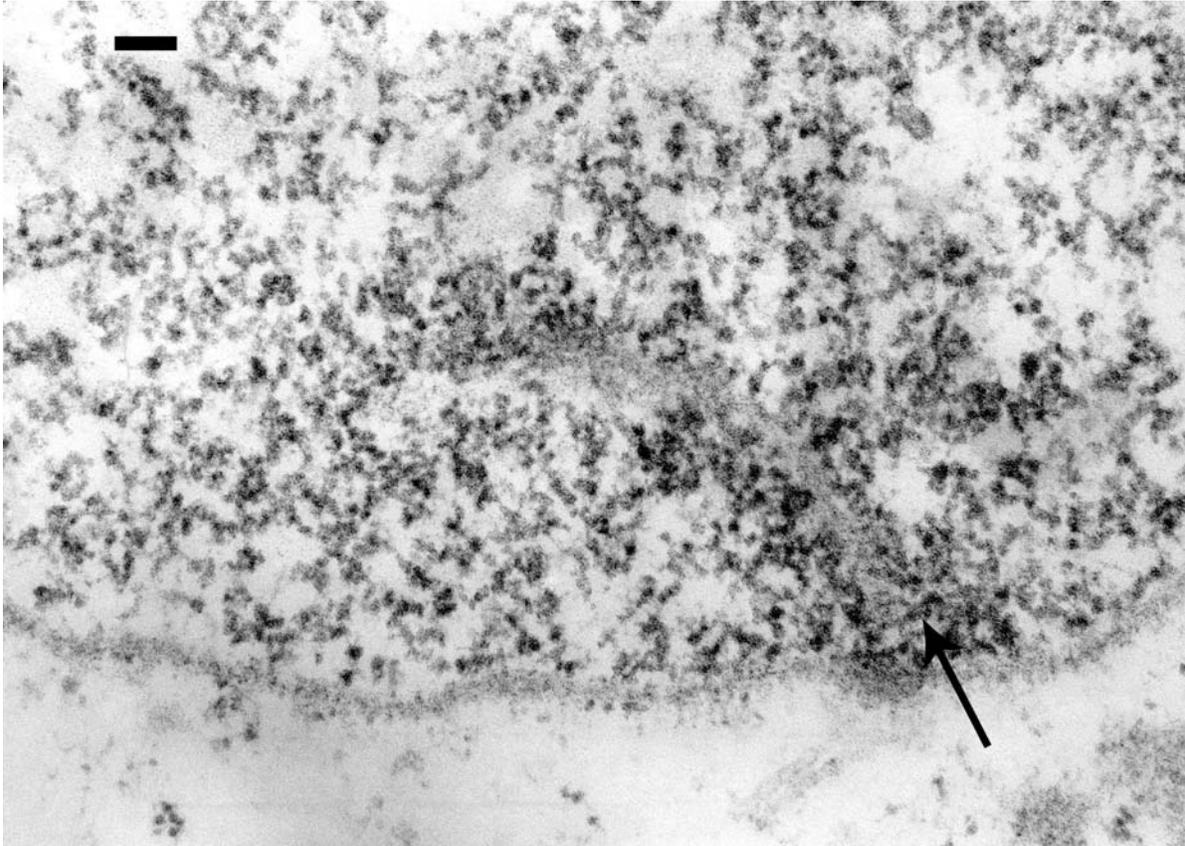


Figura 18. Fibras de ribonucleoproteínas asociadas al elemento lateral (flecha) son marcadas positivamente por esta tinción. Sin embargo, observamos que la cromatina del elemento lateral se presenta en gris claro. Tinción preferencial para RNPs. Aumento 71250 x. Barra = 100 nm.

La distribución del ADN en el núcleo en paquiteno se ve en la figura 19, gracias a la tinción específica de amina - osmio. En este estadio el ADN en su mayoría se sitúa en los elementos laterales y alrededor de CS en forma de cromatina que se compacta progresivamente a medida que avanza la profase e incluso hasta la metafase.

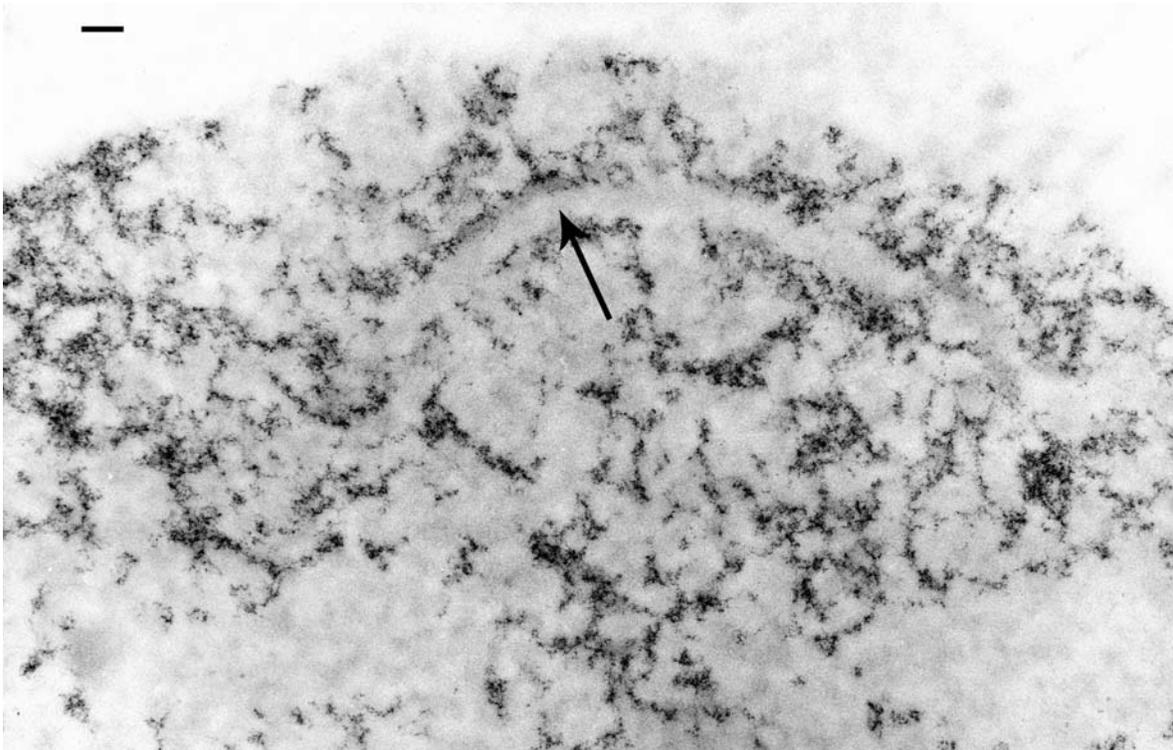


Figura 19. Disposición de ADN en el complejo sinaptonémico. Se observa claramente el espacio de exclusión de cromatina (flecha) y sólo algunas fibras corren transversalmente de un cromosoma hacia el homólogo. Tinción específica para ADN por el método de amina-osmio. Aumento 52500 x.
Barra =100 nm.

Dos filamentos paralelos que se contrastan con la tinción de la amina-osmio, pasan longitudinalmente por la cara interna del elemento lateral, semejando un collar de cuentas. De estos filamentos se extienden algunas asas cortas de ADN hacia el espacio de exclusión y otras hacia el elemento lateral, las que presentan longitudes no mayores que el ancho del propio elemento. También se observan fibras de ADN que cruzan el elemento lateral y se continúan con la cromatina que rodea el CS.

La región cromosómica adosada a la envoltura nuclear se conforma por una masa densa de filamentos con distribución aparentemente no estocástica, que se muestra claramente en la figura 20.

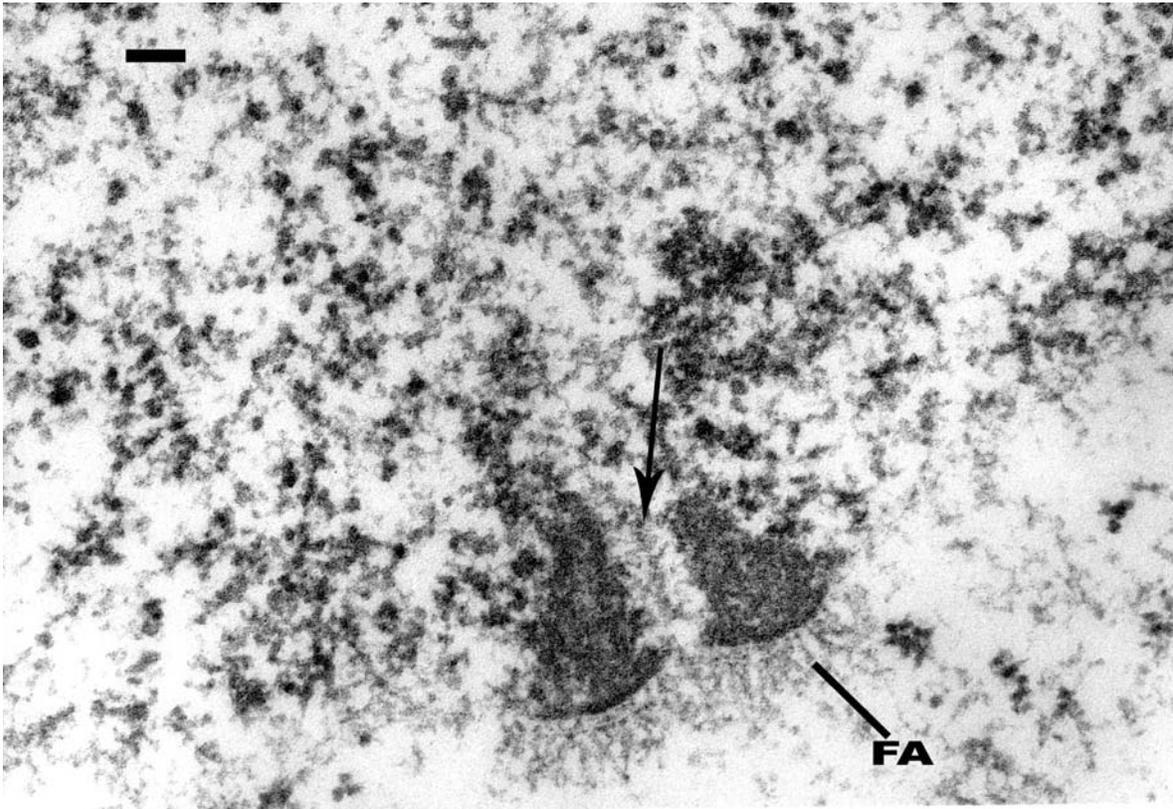


Figura 20. Placa basal del CS donde se observa las fibras de anclaje, las cuales son proteínas que unen la membrana nuclear interna a la membrana nuclear externa (FA), el elemento medial y las fibras transversas del CS (Flecha). Tinción general. Aumento 71250 x. Barra =100 nm.

Estadio diploteno

El comienzo del diploteno se caracteriza por un agudo aumento en la densidad de la cromatina. Simultáneamente suceden cambios característicos en la estructura del CS. 1.- Los filamentos transversos y el elemento central desaparecen. 2.- La apariencia de cinta del elemento lateral se pierde y sus elementos axiales abandonan el borde del espacio de apareamiento para migrar dentro de las masas de cromatina.

En el área de cromatina extendida, los restos del elemento lateral son dos filamentos paralelos rodeados por asas y pequeños cúmulos de cromatina. Estos últimos en estadios posteriores, pierden su disposición paralela y el único resto visible del apareamiento son pequeños espacios libres de ADN (Fig. 21).

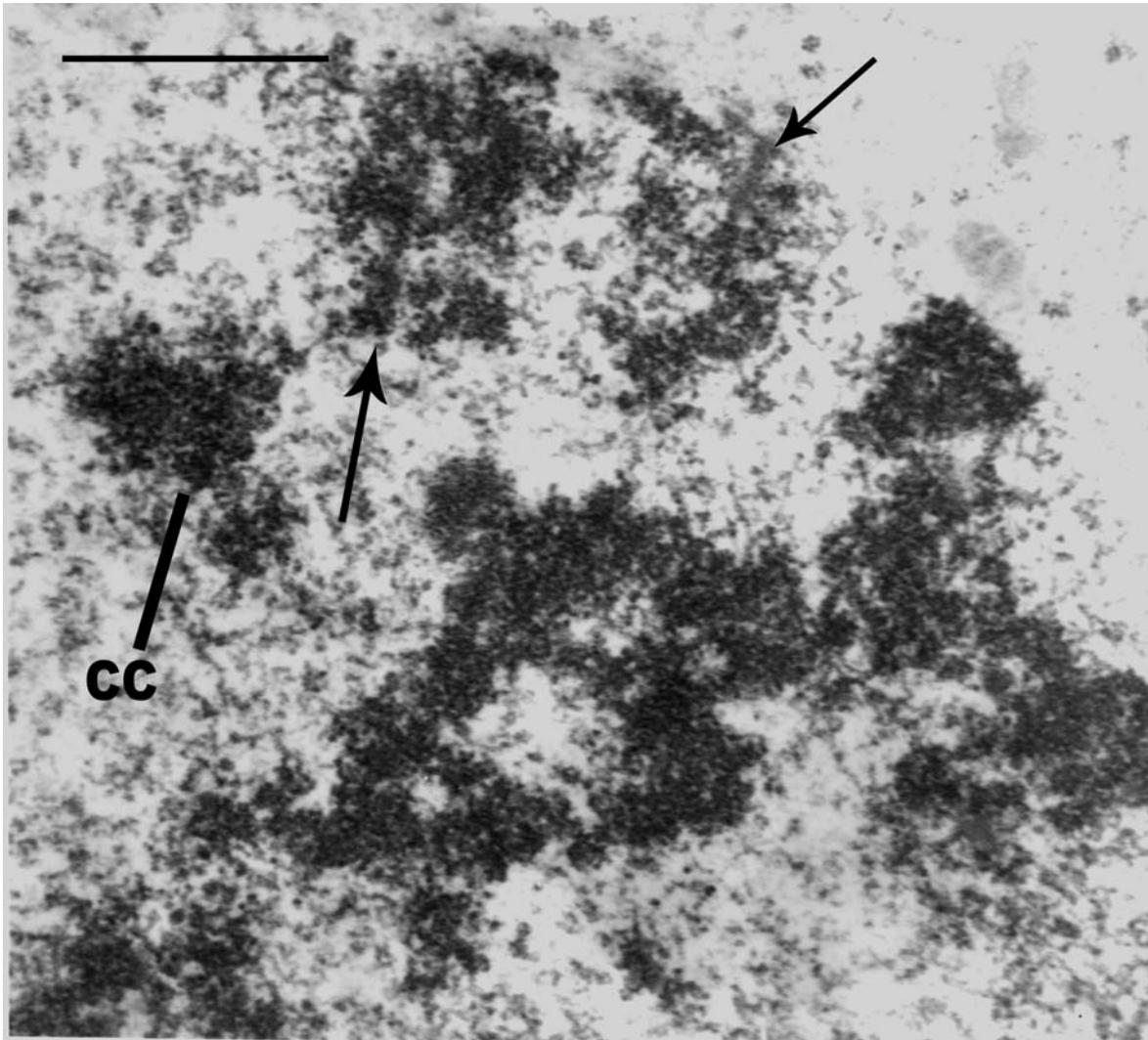


Figura 21. Núcleo de espermatocito en diploteno. Se observa grandes cúmulos de cromatina compacta (CC) y en la región periférica del núcleo la separación de cromosomas homólogos (flechas), que demuestran como desaparecen los componentes del complejo sinaptonémico y se compacta su cromatina. Tinción general. Aumento 37500 x. Barra = 1 micra.

DISCUSIÓN

Los resultados antes descritos demuestran la presencia de estructuras especiales, no encontradas en núcleos en interfase, pero sí en espermatogonias tipo "B". Así, además de los componentes estructurales usuales de núcleos interfásicos, se encuentran largos ejes irregulares de cromatina extendida asociada a partículas ribonucleoproteicas que se alterna con cromatina parcialmente condensada. Estos ejes, que comienzan el proceso de búsqueda del cromosoma homólogo, se originan en cúmulos de cromatina compacta adosada a la envoltura nuclear y parecen como un collar de cuentas de rosario; pueden llegar a medir hasta un radio nuclear.

Además, estos núcleos presentan ejes largos de cromatina extendida rodeados por filamentos, parecidos a pequeñas estructuras cromosómicas plumuladas (microplumulados) que se forman a partir del collar de cuentas así como también de cúmulos de cromatina compacta en contacto con la envoltura nuclear. El método de Bernhard, procedimiento preferencial para ARN, demuestra una fuerte asociación de gránulos y fibras RNP con las estructuras microplumuladas, por lo que se concluye que existe una intensa transcripción en estas estructuras. Esta conclusión es apoyada por la demostración de la presencia de RNA polimerasa II en las estructuras microplumuladas en trabajos anteriores (Vázquez-Nin et al., 2003).

Durante la interfase meiótica (pre-leptoteno), los cúmulos de cromatina compacta disminuyen progresivamente y el nucleolo migra a la periferia nuclear. La cromatina compacta de los ejes comienza a extenderse y da lugar a largas estructuras microplumuladas, que se componen por dos filamentos finos de ADN asociados a fibras de RNPs, paralelos y muy cercanos, uniendo sus asas a lo largo de los ejes alineados, que dan el parecido a escalerillas de cuerda. En esta fase se observan dos tipos de alineaciones de las estructuras microplumuladas, los filamentos yuxtapuestos y los filamentos axiales alineados a distancia. La pérdida de la condensación del material nuclear durante la interfase meiótica, permite la visualización de fibras de cromatina extendida alineadas en paralelo, interrelacionadas por filamentos finos y estructuras que corresponden a fibrillas de ribonucleoproteínas. Al final del estadio pre-leptoténico, la cromatina extendida y las estructuras ribonucleoproteicas están presentes en todo el espacio nuclear, lo que nos hace deducir que la transcripción es abundante.

El inicio del estadio leptoteno-zigoteno es marcado por la acumulación de material en pequeñas partes de los ejes de la estructura microplumulada. Estas zonas son generalmente cortas y muchas de ellas aparecen en pares en contacto con la envoltura nuclear. Los ejes axiales pueden visualizarse con un contraste positivo del procedimiento de tinción preferencial para ribonucleoproteínas (Bernhard 1969). La formación de elementos axiales,

sucede al mismo tiempo en que las estructuras microplumuladas, presentan regiones alineadas que se corresponden. Los elementos axiales alineados presentan numerosos filamentos que relacionan uno con el otro, y su eje principal puede continuarse con una estructura microplumulada. Esto demuestra que en el proceso de formación del elemento axial la estructura se mantiene, lo que logramos observar más claramente con reconstrucciones tridimensionales.

El eje axial al aproximarse a la envoltura nuclear, se acerca a su homólogo; por el otro lado, hacia el interior del núcleo, los pares de ejes divergen. La presencia de gran cantidad de fibras de ribonucleoproteínas demuestra que la transcripción aún presenta niveles altos en el estadio leptoteno-zigoteno.

Los elementos axiales que son cilíndricos, al aproximarse ya están paralelos.

Durante el bouquet, un gran número de elementos axiales han desaparecido. Es muy raro encontrar en la formación del complejo sinaptonémico, la continuidad con un elemento axial. Generalmente, los elementos axiales ya están alineados antes de la sinapsis. Los primeros complejos sinaptonémicos son pedazos cortos de una longitud aproximada a 1 micra en contacto con la envoltura nuclear. Los cortes seriados realizados en el presente estudio demuestran que ambos elementos laterales de estos complejos crecen simultáneamente. Nunca se han encontrado las figuras de apareamiento de elementos axiales previamente formados con la forma de "Y" descritas por los citogenetistas clásicos (Otto J.H. A. Towle, 1989, Gardner E. J. 1977). Propongo que estas imágenes son generadas por el traumatismo mecánico durante el procedimiento de la preparación de los extendidos empleados.

El elemento central y los filamentos transversos aparecen progresivamente entre los elementos laterales creando una región libre de cromatina pero rica en estructuras proteicas. Al mismo tiempo el proceso de compactación tiene lugar y se lleva a cabo la reorganización espacial de la cromatina. Durante el leptoteno-zigoteno, el complejo sinaptonémico naciente, es rodeado por capas de cromatina compacta asociadas con el elemento lateral. Los filamentos radiales de la cromatina extendida son asas que parecen cortas, debido a que se pliegan y pueden estar contenidos en el grosor del corte. Se forman también cúmulos de cromatina semi-compacta asociada a la envoltura nuclear.

La formación del complejo sinaptonémico puede darse de dos maneras: 1) en continuidad con estructuras microplumuladas o 2) en estructuras de escalerilla de doble cuerda.

Infiero que las estructuras encontradas en espermatogonias tipo "B", son la forma en la que el cromosoma realiza la búsqueda de su homólogo, ya que este proceso involucra acciones a larga distancia dentro del núcleo, las cuales son realizadas por una o varios tipos de macromoléculas, proteínas, ADN y/o ARN. Dawe (1998) y Cook (1997) proponen, que las proteínas pueden

funcionar como sistema inicial de atracción. Sin embargo, la atracción puede ocurrir después del reconocimiento de secuencias homólogas. Sybenga (1999) propone que priones o proteínas parecidas a priones, pueden formar fibras semi-estables conectando segmentos homólogos de cromosomas. Muchos autores consideran que el ADN está involucrado en la búsqueda inicial de homología, reconocimiento y apareamiento (Loidl, 1990; Moens, 1994; Kleckner, 1996; Sybenga, 1999). No obstante, la cadena doble de ADN no es eficiente en reconocer la homología y la cadena sencilla de suficiente longitud, no logra aparearse al cromosoma homólogo ya que es sensible al ataque por endonucleasas.

Los cromosomas homólogos en dípteros (Wandall y Svendsen, 1985) y algunas levaduras (Scherthan et al, 1994; Weiner y Kleckner, 1994) presentan asociaciones somáticas, que aparentemente desaparecen durante la replicación del ADN. También los movimientos de formación del bouquet pueden alterar asociaciones previas de cromosomas homólogos (Sybenga, 1999). De cualquier manera, en muchos estudios de animales, plantas y hongos se observan alineamientos de cromosomas homólogos antes de la aparición de los telómeros organizados en el bouquet (Kleckner, 1998; Mikhailova, et al, 1998; Martínez-Pérez, et al, 1999; Zickler y Kleckner, 1999).

Otros proponen que la búsqueda de homología y la alineación de cromosomas homólogos, generalmente se desarrollan durante el estadio leptoteno y zigoteno (Cook, 1997; Scherthan et al., 1996; Scherthan et al., 1998).

Nuestras observaciones demuestran que las fases leptoteno y zigoteno no son fases distintas, sino el proceso de reconocimiento, alineación y apareamiento de los cromosomas. Esto debido a que se observa la continuidad entre elementos axiales y estructuras microplumuladas y por otro lado la continuidad de escalerillas de doble cuerda con microplumulados, lo cual nos dice que los espermátocitos presentan características de leptoteno y zigoteno a la vez. Estas características son: el crecimiento de los ejes cromosómicos, que es un proceso clásicamente leptoténico, se produce al mismo tiempo que la formación del complejo sinaptonémico, que es un proceso típico del zigoteno.

La formación de elementos axiales aislados la interpretamos como intentos fallidos de un reconocimiento de homología y alineamiento durante el pre-leptoteno. Aparecen en la etapa, leptoteno-zigoteno por la incorporación de tinción oscura del material en el filamento axial de la estructura preexistente, es decir la estructura microplumulada la cual se mantiene.

También mostramos que la alineación se lleva a cabo por la asociación de los filamentos radiales de las estructuras microplumuladas, que comienza en espermatogonia tipo "B" y está continuamente presente hasta el estadio

leptoteno-zigoteno avanzado. Estudios de Clermont (1960) del epitelio seminífero del puerco de guinea con microscopía de luz, indican que las espermatogonias tipo "B", divididas mitóticamente en estadio VI, producen dos espermatoцитos primarios ("resting") o sea en interfase meiótica o mejor llamadas en pre-leptoteno. Nuestras observaciones claramente demuestran la presencia de estructuras microplumuladas durante ambas fases.

También pusimos de manifiesto que las conexiones entre ejes distantes de cromatina compacta que se alterna con cromatina extendida, se establecen por largos filamentos laterales-radiales de cromatina extendida en transcripción, que son tan largos como la mitad del diámetro nuclear. Estos finos filamentos radiales son probables asas, que no pueden ser trazadas a lo largo de toda su longitud, por que rara vez se extienden en el plano del corte. El filamento es más fino que el grosor del corte, por lo tanto la superposición de otras estructuras en la imagen proyectada impide su visualización completa. Los filamentos radiales, aparentemente corresponden a amplias sondas de prueba, que son necesarias para el reconocimiento efectivo de secuencias homólogas y están relacionados muy probablemente con el alineamiento progresivo de cromosomas a distancia. Esta alineación puede darse por la estabilización de reconocimiento de secuencias homólogas y por la inestabilidad de las interacciones de secuencias no homólogas. Así pues, la escalerilla de doble cuerda es la relación de dos estructuras microplumuladas homólogas, que progresivamente se conectan por numerosos filamentos antes de la llegada del estadio leptoteno-zigoteno. La reflexión de nuestros resultados concuerda con la revisión teórica previa de Kleckner y Weiner (1993), que trata del papel de las interacciones inestables en el apareamiento. Weiner y Kleckner, (1994) quienes estudiaron la profase meiótica en levaduras, encuentran que la amplia distribución de filamentos radiales ya asociados se conectan en determinadas secuencias genéticas.

Sin embargo, propongo que estas conexiones de apareamiento comienzan en espermatogonias tipo "B".

Cuando inician los movimientos del bouquet, muchos de los apareamientos de estructuras microplumuladas están alineadas a lo largo, a una distancia menor de 700 nm. La mayoría de los elementos axiales comienzan su formación en contacto con la envoltura nuclear durante el leptozigoteno; secciones cortas del elemento microplumulado alineadas adquieren una tinción oscura por acumulación de material nuclear que podría ser ARN.

Estas observaciones indican que el crecimiento de los elementos axiales característicos del leptoteno se producen al mismo tiempo que la formación del complejo sinaptonémico, típica del zigoteno. Sin embargo, siempre existe algún elemento axial no apareado y sin alinear.

Un proceso altamente conservado en meiosis es el bouquet. Se le implica frecuentemente en el apareamiento de cromosomas homólogos (Zickler y Kleckner, 1998). Los resultados demuestran que muchos de los reconocimientos y alineamientos de cromosomas homólogos se llevan a cabo antes de la formación del bouquet. De cualquier manera una fuerza de origen citoplasmático acerca los telómeros desde los extremos en contacto con la envoltura nuclear; esta fuerza actúa sobre el establecimiento de enlaces entre cromosomas homólogos, en forma de fibras compuestas por cromatina y puentes de ribonucleoproteínas en el espacio entre regiones homólogas del cromosoma. Puede ser en este momento, cuando los elementos axiales no alineados comienzan el reconocimiento de secuencias homólogas. Una de las posibles funciones del bouquet podría ser el asegurar el reconocimiento "silencioso" de cromosomas homólogos no alineados por llevarlos uno junto al otro, mecanismo de reserva propuesto por Zickler y Kleckner (1998).

Con ayuda de los métodos de tinción citoquímica utilizados en mi trabajo, observamos que las conexiones entre estructuras microplumuladas están compuestas de fibras de ARN y ADN y por lo tanto es cromatina extendida.

Podemos inferir que los apareamientos efectivos están asociados con secuencias clave (McKee, 1998; Sybenga, 1999).

La gran cantidad de ARN en los núcleos de espermatoцитos en pre-leptoteno y en lepto-zigoteno podría deberse a dos fenómenos: primero, la elevada transcripción a la que ya hice mención y otro podría ser la baja salida del ARN mensajero hacia el citoplasma. Para que el ARN mensajero salga del núcleo es necesario que la molécula recién sintetizada sufra el proceso de "splicing", que consiste en cortar los intrones de la cadena de ARN para su posterior exportación y traducción al citoplasma. Estudios previos muestran que en los estadios mencionados las macromoléculas relacionadas con el "splicing" son escasas (Vázquez-Nin et al., 2003), lo que sugiere una disminución en la exportación hacia el citoplasma de los ARN mensajeros, que entonces se concentran en el núcleo.

Una característica importante que hay que destacar en espermatogonias tipo "B", pre-leptoteno y profase meiótica temprana es que presentan fibras finas de ribonucleoproteínas y gránulos intercromatinianos en abundancia pero los gránulos pericromatinianos son escasos. Los gránulos intercromatinianos están altamente enriquecidos en snRNAs ("small nuclear RNAs"), que forman junto con proteínas como el SC-35 y los snRNPs, factores de "splicing" que se almacenan en pequeños gránulos y/o pueden estar relacionados con el ensamblaje del "spliceosoma". También es posible que los gránulos intercromatinianos estén relacionados con la regulación del envío y/o coordinación del transporte de todos los ARN nucleares al citosol.

Sin embargo, existen otras estructuras de almacenamiento, los gránulos pericromatinianos que contienen ARN mensajero o ARN pre-mensajero de larga vida media nuclear (Vázquez-Nin GH, Echeverría M. 1996). La intensa transcripción que ocurre en estos estadios, la pequeña porción de exportación, así como la escasez de partículas de almacenamiento de ARN por largos periodos, sugiere que muchos de los ARN sintetizados, están involucrados en una función nuclear y la hidrólisis sin salida del núcleo. Todo este fenómeno sucede a la par con el proceso de reconocimiento de secuencias homólogas, alineamiento y apareamiento en espermatozoides en estadios tempranos de la meiosis. Por lo tanto, los hnRNAs están en el lugar y momento adecuado, que es en el espacio de reconocimiento, alineamiento y apareamiento de los cromosomas homólogos.

En paquiteno se observa el incremento en la frecuencia de gránulos pericromatinianos, el cual relacionamos con la demora de exportación del ARN mensajero para ser transportados fuera del núcleo, como se sugiere por diversos autores (Taylor, 1959; Monesi, 1965; Söderstrom, 1976; Geremía et-al, 1977; Eddy and O'Brien, 1998).

La importancia del ARN en la búsqueda del cromosoma homólogo, rara vez es tomada en cuenta (Cook, 1997). Sin embargo, existen varios reportes donde se destaca un nivel alto de transcripción durante la profase meiótica. Existen varios trabajos donde se reporta el nivel de transcripción, desde levaduras hasta hongos. Se observa transcripción alta en meiocitos de cada especie en varios organismos, y por lo tanto, gran libertad o soltura en la regulación de la expresión génica (Kaback y Feldberg, 1985; Magee, 1987; Cook, 1997). Esto concuerda con el punto de vista de que el hnRNA en meiosis, aparentemente no tiene ARN mensajero con función específica, sino que está relacionado con el reconocimiento de secuencias en múltiples locus a lo largo del cromosoma. El ARN de cadena simple puede reconocer secuencias complementarias con mayor eficiencia que la doble cadena de ADN y puede establecer conexiones requeridas y acertadas durante la búsqueda de homólogas.

Tenemos evidencias no directas del proceso molecular involucrado; imaginamos que la estructura microplumulada funciona como la disposición con mayor eficiencia, que adquieren las moléculas para acercarse con la secuencia complementaria del homólogo, que a su vez está en transcripción y a veces se localizan lejos uno del otro. En consecuencia propongo que las estructuras microplumuladas en plena transcripción que se localizan en espermatogonias tipo "B", espermatozoides en Interfase meiótica y en estadio leptoteno-zigoteno, están implicadas en la búsqueda, reconocimiento y apareamiento de cromosomas homólogos. También sugerimos que el ARN recién sintetizado es el actor directo involucrado en la búsqueda, reconocimiento y apareamiento de homólogas. Nos basamos en nuestras observaciones empleando técnicas citoquímicas e inmunocitoquímicas, así

como en las reconstrucciones tridimensionales realizadas mediante cortes seriados.

Cabe señalar que en paquitenio, cuando el apareamiento se completó no se detectan ARN en ningún componente del CS ya formado. Lo anterior concuerda con las observaciones previas usando el procedimiento de tinción preferencial para RNP's (Vázquez-Nin y Echeverría M., 1976).

A nivel molecular la hipótesis más aceptada para el reconocimiento de secuencias homólogas, implica la formación de duplicaciones de moléculas complementarias al ADN no hermano (Smithes and Powers, 1986; Loidl, 1990; Kleckner et-al, 1991; Kleckner and Weiner, 1993; Moens, 1994; Weiner and Kleckner, 1994; Kleckner, 1996; McKee, 1996).

La sinapsis de cromosomas homólogos comienza a partir de alineaciones preexistentes de ejes axiales durante leptoteno-zigoteno, a una distancia corta o en contacto con la envoltura nuclear, pero a veces también en la región interna del núcleo. Este proceso de sinapsis comprende tres pasos o fases: -acercamiento de elementos axiales paralelos, transformación de elementos axiales próximos en elementos laterales del complejo sinaptonémico y elongación de CS desde las extremidades de este, hacia el elemento axial corto. La fuerza implicada en el acercamiento final no se conoce. Sin embargo, los filamentos de cromatina en transcripción que se encuentran en el espacio entre los elementos axiales, sufren una transformación, cuando estos elementos axiales cambian su disposición a elementos laterales. Esto implica una reorganización importante de la cromatina. El espacio entre elementos laterales es desocupado de cromatina y partículas RNP, cuando el elemento central y filamentos transversos aparecen.

Cuidadosos estudios de pre-leptoteno, y de los estadios iniciales de la profase meiótica demostraron que las estructuras microplumuladas se desarrollan ya alineados en pares asociados por filamentos transversos de cromatina en transcripción.

Cuando comienza la sinapsis, los elementos axiales no están completamente formados (Sherthan et al, 1996). Nuestras observaciones indican que el desarrollo de ejes axiales y la formación del CS son fenómenos simultáneos en la gran mayoría de los bivalentes.

La estructura y función característica de leptoteno, el crecimiento de elementos axiales, las estructuras y funciones del zigoteno que son el apareamiento final y la formación del CS naciente, tienen lugar al mismo tiempo, en un estadio continuo leptoteno-zigoteno, donde los eventos del proceso meiótico son simultáneos. Al comenzar el estadio se observa con

frecuencia complejos sinaptonémicos cortos que se continúan con escalerillas de doble cuerda y estructuras microplumuladas pero no con elementos axiales. Esto nos indica que el crecimiento del elemento lateral del CS mantiene la alineación del eje central de la estructura microplumulada, como también las fibras de ADN y ARN.

Por otro lado, unos pocos elementos axiales aislados comienzan su desarrollo durante pre-leptoteno o interfase meiótica, sin reconocer a su homólogo y sin tener una alineación. Estos elementos axiales pasan por la etapa clásica de leptoteno, es decir, el desarrollo de ejes axiales largos que se continúan hasta el zigoteno y se distinguen por su apareamiento que sucede hasta después de la formación del bouquet.

Durante el estadio leptoteno-zigoteno la cromatina que está en contacto con los elementos laterales se condensa, así como las numerosas fibras de cromatina dispersa que aparecen alrededor del CS en formación. Los extremos del complejo en crecimiento, frecuentemente presentan redes de asas dispersas de cromatina en todas direcciones, en proceso de compactación lo cual nos dice de un importante re-arreglo de la cromatina.

Todo lo anterior nos lleva a proponer que los núcleos en el estadio meiótico leptoteno y zigoteno de la rata, en realidad es un estadio continuo (leptoteno-zigoteno) debido a que no tiene un límite claro entre uno y otro, y probablemente en otros mamíferos suceda igual.

CONCLUSIONES

- Los núcleos de espermatogonias tipo "B" presentan 2 tipos de estructuras, no antes vistas en núcleos interfásicos de otros tipos celulares. Contienen ejes irregulares de alternancia de cromatina condensada y extendida, y las pequeñas estructuras tipo microplumulado de cromatina extendida en proceso de transcripción.
- En la interfase meiótica -que corresponde al período G2 también llamado pre-leptoteno- las estructuras microplumuladas están reconociéndose y sus filamentos radiales conducen a la alineación en paralelo de los ejes, que se relacionan por numerosos filamentos transversos de cromatina extendida en transcripción. Esta relación íntima de estructuras microplumuladas, la denominamos escalerilla de doble cuerda.
- El elemento axial aparece en lepto-zigoteno por la incorporación de tinción en el filamento axial de la estructura microplumulada, debido a la acumulación de ribonucleoproteínas.
- El elemento axial mantiene la estructura preexistente del microplumulado.
- Durante lepto-zigoteno los elementos axiales se forman alineados con su par, aunque separados por varios cientos de nm.
- Los largos filamentos radiales de cromatina extendida que están por fuera del apareamiento de los ejes, se acortan durante lepto-zigoteno, formando la cromatina que rodea al complejo sinaptonémico.
- El complejo sinaptonémico se forma por un proceso complejo que involucra el crecimiento simultáneo de los dos elementos laterales por incorporación de cromatina y RNPs de los ejes de los elementos microplumulados previamente alineados en forma de escalerillas de cuerdas. Nunca se ha visto el apareamiento de ejes cromosómicos previamente formados pero no alineados.
- EL proceso de transformación de una escalerilla de cuerdas en un complejo sinaptonémico involucra varios tipos de cambios conformacionales de la cromatina. Uno de ellos es la formación del espacio de exclusión que se transforma en el espacio central del complejo, otro es la aparición de pliegues pequeños a nivel de la cromatina de los ejes de los microplumulados en el momento de formar los elementos axiales.
- El procedimiento de tinción de Bernhard, preferencial para ribonucleoproteínas, tiñe positivamente: Los brazos laterales, el filamento axial de la estructura microplumulada, los filamentos transversos de la escalerilla de doble cuerda y el complejo sinaptonémico en el proceso de formación. Esto indica que contienen ARN.

BIBLIOGRAFÍA.

- Alberts B; Bray D; Lewis J; Raff M; Roberts K. and Watson J. 1995. Molecular Biology of the Cell. Third Edition. Garland publishing, Inc. New York and London.
- Ashley T. 1988. G-Bands position effects on meiotic synapsis and crossing-over. Genetics 118: 307-317.
- Bähler J., Wyler T., Loidl J., Kohli J. 1993. Unusual nuclear structures in meiotic prophase of fission yeast: A cytological analysis. J. Cell Biol. 121:241-256.
- Bailey F.R., Smith P.E., Copenhaver W.M. Histología. 1950. Duodécima edición 1948. López y Etchegoyen, S.R.L. Buenos Aires Argentina. pp.669-690.
- Bernhard W. 1969. A new staining procedure for electron microscopical cytology. J Ultrastruct Res 27: 250-265.
- Carpenter A. 1975. Electron microscopy of meiosis in Drosophila melanogaster females. II. The recombination nodule a recombination associated structure at pachytene? Proc Natl Acad Sci USA 72: 3186-3189.
- Carpenter A. 1979-a. Recombination nodules and synaptonemal complex in recombination-defective females of Drosophila melanogaster. Chromosoma 75: 259-292.
- Carpenter A. 1979-b. Synaptonemal complex and recombination nodules in wild-type Drosophila melanogaster females. Genetics 92: 511-541.
- Clermont Y. 1960. Cycle of the seminiferous epithelium of the guinea pig. Fert Steril 6 : 563-573.
- Cogliatti R, Gautier A. Mise en évidence del ADN et des polysaccharides á l'aide d'un nouveau réactif de type Schiff. CR Acad Sci D 1973; 276: 1371-1374.
- Comings DE, Okada TA 1970. Mechanisms of chromosome pairing during meiosis. Nature 227: 451-456.
- Cook P.R. 1997. The transcriptional basis of chromosome pairing. J. Cell Science 110: 1033-1040.
- Dawe R.K. 1998. Meiotic chromosome organization and segregation in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49: 371-395.
- De Robertis, E., De Robertis, E. 1989. Molecular Biology of the cell. Lea & Febegr. Philadelphia. Edición nueve. Capitulo 16.
- Eddy E. M., O'Brien D.A. 1998. Gene expression during mammalian meiosis. In: Meiosis and gametogenesis, ed. M.A. Handel, New York, USA, Academic Press: 141-200.
- Esponda P, Stockert JC. 1971. Localization of RNA in the synaptonemal complex. J Ultrastruct Res 35: 411-417.
- Friedman B., Bouchard R., Stern H. 1982. DNA sequences repaired at pachytene exhibit strong homology among distntly related higher plants. Chromosoma 87: 409-424.
- Gardner E. J. 1977. Principios de genética. 2ª Edición. Limusa. México DF.
- Geremia R., Boitani C., Conti M., Monesi V. 1977. RNA sintesis in spermatocytes and spermatids and preservation of meiotic RNA during spermiogenesis in mouse. Cell Differentiation 5: 343-355.

- Gillies CB. 1975. Synaptonemal complex and chromosome structure. Annu Rev Genet 9: 91-109.
- Jenkins G., Okumus A. 1992. Indiscriminate synapsis in achiasmatic *Allium fistulosum* L. (Liliaceae). J. Cell Science. 103:415-422.
- Jiménez LF, Merchant H. Biología celular y molecular. 2003. Capítulo 27: Salamanca FA. 1ª Edición. Pearson Educación. México. pp. 807-836.
- Kaback DB., Feldberg LR. 1985. Yeast cells exhibit a sporulation-specific temporal program of transcript accumulation. Mol Cell Biol 5: 751-761.
- Karpova O., Penkina M., Dadashev S., Mil'shina N., Hernández J., Radchenko Y, Bogdanov Y. 1995. Features of primary structure of DNA from the synaptonemal complex of the golden hamster. Mol. Biol. (mosk) 29: 512-521.
- Kleckner N., Padmore R., Bishop D.K., 1991. Meiotic chromosome metabolism: one view. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 56: 729-743.
- Kleckner N., Weiner B.M. 1993. Potential advantages of unstable interactions for pairing of chromosomes in meiotic, somatic and premeiotic cells. Cold Spring Harbour Symposia on Quantitative Biology 63: 553-565.
- Kleckner N. 1996. Meiosis: How could it work? Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8167-8174.
- Kurata N., Ito M. 1978. Electron microscope autoradiography of ³H-thymidine incorporation during zygotene stage in microsporocytes of Lily. Cell struct. Function 3: 349-356.
- Latos-Bielenska A., Trautmann, Vogel W. 1990. Visualization of DNA in pachytene by monoclonal antibodies against BrdU reveals synaptonemal complex-like structures. Cytogenet. Cell Genet. 54: 24-28.
- Leblond C.P. and Clermont Y. 1952. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. Annals New York Academy of Sciences 55: 548-569.
- Leeson T. S., Leeson C. R., A. A. Paparo. 1990. Texto/ Atlas de histología. Mc Graw Hill. México. Pp 635-667.
- Loidl J. 1990. The initiation of meiotic chromosome pairing: the cytological view. Genome 33: 759-778.
- Loidl J. 1991. Coming to grips with a complex matter. Chromosoma 100: 289-292.
- Loidl J., Nairz K., Klein F. 1991. Meiotic chromosome synapsis in haploid yeast. Chromosoma 100: 221-228.
- Magee P.T. 1987. Transcription during meiosis. In: Meiosis, ed. P.B. Moens, Orlando, Florida USA, Academic Press: 355-381.
- Martínez-Pérez E., Shaw P., Reader S., Aragón-Alcaide L., Miller T., Moore G. 1999. Homologous chromosome pairing in wheat. J. Cell Sci. 112: 1761-1769.
- McKee B.D. 1996. The license to pair: identification of meiotic pairing sites in *Drosophila*. Chromosoma 105: 135-141.
- McKee B.D. 1998. Pairing sites and the role of chromosome pairing in meiosis and spermatogenesis in male *Drosophila*. Handel MA, editor. Meiosis and gametogenesis. San Diego: Academic Press. Pp 77-115.

- McKim K, Green-Marroquin BL, Sekelsky JJ, Chin G, Steinberg C, Khodosh R, Hawley RS. 1998. Meiotic synapsis in the absence of recombination. Science 279: 876-878.
- Mikhailova E.L., Naranjo T, Shepherd K, Wennekes van Eden J., Heyting C., Jong J.H. 1998. The effect of the wheat Ph1 locus on chromatin organization and meiotic chromosome pairing analyzed by genome painting. Chromosoma 107: 339-350.
- Moens P. B. 1994. Molecular perspectives of chromosome pairing at meiosis. BioEssays 16: 101-106.
- Monesi V. 1965. Synthetic activities during spermatogenesis in the mouse. Exp. Cell Res. 39: 197-224.
- Monneron A., Bernhard W. 1969. Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. J. Ultrastruct. Res. 27:266-278.
- Moses MJ. 1956. Chromosomal structures in crayfish spermatocytes. J Biophys Biochem Cytol 2: 363-412.
- Moses MJ. 1968. Synaptonemal complex. Annu Rev Genet 2: 363-412.
- Muckenthaler F.A. 1964. Autoradiographic study of nucleic acid synthesis during spermatogenesis in the grasshopper *Melanoplus differentialis*. Exp. Cell. Res. 35: 531-547.
- Ortiz R., Echeverría O.M., Ubaldo E., Carlos A., Scassellati C., Vázquez-Nin G.H. 2002. Cytochemical study of the distribution of RNA and DNA in the synaptonemal complex of guinea-pig and rat spermatocytes. Eur. J. Histochemistry 46:133-142.
- Otto J.H., Towle A., 1989. Biología Moderna. McGraw Hill. México. 621 pp.
- Passy SI, Yu X, Li Z, Radding Ch M, Masson JY, West S, Egelman EH. 1999. Human Dmc1 Protein binds DNA as an octameric ring. Proc Natl Acad Sci USA 96: 10684-10688.
- Pearlman R., Tsao N., Moens P. 1992. Synaptonemal complexes from DNase-Treated rat pachytene chromosomes contain (GT)_n and LINE/SINE sequences. Genetics 130: 865-872.
- Rasmussen S. W. 1977. Meiosis in *Bombix mori* females. Phil. Trans. R. Soc. B. 277: 343-350.
- Satyanarayana K., Strominger J. 1992. DNA sequences near a meiotic recombinational breakpoint within the human HLA-DQ region. Immunogenetics 35: 235-240.
- Scherthan H., Bähler J. and Kohli J. 1994. Dynamics of chromosome organization and pairing during meiotic prophase in fission yeast. J. Cell Biol. 127: 273-285.
- Scherthan H., Weich S., Schwegler H., Heyting C., Härle M. and Cremer T. 1996. Centromere and telomere movements during early meiotic prophase of mouse and man are associated with the onset of chromosome pairing. J. Cell Biol. 134: 1109-1125.
- Scherthan H., Elis R., Trelles-Sticken E., Dietsel S., Cremer T., Walt H. And Jauch A. 1998. Aspects of three-dimensional chromosome reorganization during the onset of human male meiotic prophase. J. Cell Sci. 111: 2337-2351.

- Schulz-Schaeffer, J. 1980. Cytogenetics: Plants, Animals, and Human. Springer-Verlag, New York.
- Smith A. Benavente R. 1992. Identification of a structural protein component of rat synaptonemal complexes. Exp Cell Res 198: 291-297.
- Smithies O. Powers P. 1986. Gene conversions and their relation to homologous chromosome pairing. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 312: 291-302.
- Söderström KO. 1976. Characterization of RNA synthesis in mid-pachytene spermatocytes of the rat. Exp Cell Res 102: 327-245.
- Solari A.J. 1999. Genética Humana. Fundamentos y aplicaciones en medicina. 2ª Ed. Panamericana Argentina.
- Sotelo JR. 1969 Ultrastructure of chromosomes at meiosis. In: Lima de Faria A. (de) Handbook of molecular cytology. North-Holland, Amsterdam, pp 412-434.
- Sybenga J. 1999. What makes homologous chromosome find each other in meiosis. A review and an hypothesis. Chromosoma 108: 209-219.
- Stack S. 1973. The synaptonemal complex and the achiasmatic condition. J Cell Science. 13: 83-95.
- Stern H, Hotta Y. 1978. Regulatory mechanisms in meiotic crossing-over. Ann Rev Plant Physiol 29: 415-436.
- Stern H, Hotta Y. 1984. The organization of DNA segments undergoing repair synthesis during pachitene. Chromosoma 89: 127-137.
- Swanson CP. Merz T. Young WJ. 1981. Cytogenetics: the chromosome in division inheritance and evolution. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New York. 2a. Edición. Capítulo 4.
- Taylor H. 1959. Autoradiographic studies of nucleic acids and proteins during meiosis in *Lilium longiflorum*. Am J. Botany 46: 477-484.
- Vázquez-Nin GH. Echeverría OM. 1976. Ultrastructural study on the meiotic prophase nucleus of rat oocytes. Acta Anat 96: 218-231.
- Vázquez-Nin GH. Flores E. Echeverría OM. Merkert H. Benavente R. Wettstein R. 1993. Inmunocytochemical localization of DNA in synaptonemal complexes of rat and mouse spermatocytes and chick oocytes. Chromosoma 102: 457-463.
- Vázquez-Nin GH. Biggiogera M. Echeverría OM. 1995. Activation of osmium ammine by SO₂-generating chemicals for electron microscopy Feulgen-type staining of DNA. Eur. J. Histochemistry 39:101-106.
- Vázquez-Nin GH, Echeverría OM. 1996. The polytene nucleus in morphological, cytochemical, and functional studies of messenger RNA transcription, processing, and transportation. Eur J Histochem 40: 7-16.
- Vázquez-Nin GH. Echeverría OM. 2000. Introducción a la Microscopía Electrónica Aplicada a las Ciencias Biológicas. Fondo de Cultura Económica. México. 168 pp.
- Vázquez-Nin GH. Echeverría OM. Ortiz R. Scassellati C. Martin TE. Van Dick E. Dahmus ME. Ubaldo E. Fakan S. 2003. Ultrastructural and cytochemical analysis of homologous chromosome recognition, alignment, and pairing in guinea pig spermatogonia and early meiotic prophase. Biol Rep. 69:1362-1370.

- von Wettstein D. 1977. The assembly of the synaptonemal complex. Phil. Trans R Soc Lond B 277: 235-243.
- von Wettstein D., Rasmussen W, Holm PB. 1984. The synaptonemal complex in genetic segregation. Ann Rev Genet 18: 331-413.
- Wandall A. and Svendsen A. 1985. Transition from somatic to meiotic pairing and progressional change of the synaptonemal complex. Chromosoma 92: 254-264.
- Weiner B. M. and Kleckner N. 1994. Chromosome pairing via multiple interstitial interactions before and during meiosis yeast. Cell 77: 977-991.
- Welsch B. 1973. Synaptonemal complex und chromosomenstruktur in der achiasmatischen Spermatogenese von *Panorpa communis* (Mecoptera). Chromosoma 43: 19-74.
- Westergaard M, von Wettstein D. 1970. Studies on the mechanisms of crossing over. IV. The molecular organization in Neotiella (Cooke) Saccardo (Ascomycetes) CR Trav Lab Carlsberg 37: 239-268.
- Westergaard M, von Wettstein D. 1972. The synaptonemal complex. Ann Rev Genet 6: 71-76.
- Wolfe S.L. 1972. Biology of the cell. Belmont Cal. Wadsworth Publising Company.
- Wolstenholme DR, Meyer GF. 1966. Some fact concerning the nature and formation of axial core structures in spermatids of *Gryllus domesticus*. Chromosoma 18: 272-286.
- Zickler D, Kleckner N. 1998. The leptotene-zygotene transition of meiosis. Annu. Rev. genet. 32: 619-697.
- Zickler D, Kleckner N. 1999. Meiotic chromosomes: integrating structure and function. Annu Rev Genet 33: 603-754.